



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

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

(11) 
1-0021857

(51)⁷ **C12N 15/09, C07K 16/28, C12P 21/08,**
A61P 35/00, A61K 39/395

(13) **B**

(21) 1-2012-00880

(22) 22.10.2010

(86) PCT/US2010/053686 22.10.2010

(87) WO2011/050242 28.04.2011

(30) 61/254,474 23.10.2009 US

(45) 25.10.2019 379

(43) 25.09.2012 294

(73) 1. MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (US)

The Takeda Oncology Company, 40 Landsdowne Street Cambridge, MA 02139,
United States of America

2. AMGEN BRITISH COLUMBIA INC (CA)

7990 Enterprise Street Burnaby, BC V5A 1V7, Canada

(72) NAM, Samuel, S. (US), GREENFIELD, Edward, A. (US), BABCOOK, John (US),
O'KEEFE, Theresa (US)

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) **PHÂN TỬ KHÁNG THỂ KHÁNG GUANYLYL XYCLAZA C (GCC) VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA PHÂN TỬ KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến các phân tử kháng thể gắn kết với GCC, cũng như các phân tử liên quan, ví dụ, các axit nucleic mã hóa các phân tử kháng thể này, các dược phẩm, và các phương pháp liên quan, ví dụ, các phương pháp chữa bệnh và chẩn đoán bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử kháng thể gắn kết với GCC, cũng như các phân tử liên quan, ví dụ, các axit nucleic mã hóa các phân tử kháng thể này, các dược phẩm, và các phương pháp liên quan, ví dụ, các phương pháp chữa bệnh và chẩn đoán bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Guanylyl cyclaza C (Guanylyl cyclase C-GCC) là thụ thể bề mặt tế bào xuyên màng có chức năng duy trì dịch lỏng trong ruột, ổn định nội mô chất điện phân và tăng sinh tế bào, xem, ví dụ, Carrithers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3018-3020 (2003). GCC được biểu hiện ở các tế bào niêm mạc lót ruột non, ruột già và trực tràng (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). Sự biểu hiện GCC được duy trì khi có sự biến đổi thành khối u của các tế bào biểu mô ruột, với sự biểu hiện trong tất cả các khối u đại trực tràng nguyên phát và di căn (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra một số kháng thể kháng GCC, bao gồm cả hai kháng thể của người và chuột. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các phân tử kháng thể kháng GCC, như được bộc lộ ở đây. Các phân tử kháng thể kháng GCC là hữu ích làm các phân tử kháng thể trần và làm các thành phần của các thể liên hợp miễn dịch. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các thể liên hợp miễn dịch chứa phân tử kháng thể kháng GCC và dược chất hoặc chất đánh dấu. Sáng chế cũng đề xuất các dược phẩm chứa các phân tử kháng thể kháng GCC và các thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng các phân tử kháng thể kháng GCC và các thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây để phát hiện GCC và các tế bào hoặc các mô biểu hiện GCC; để chẩn đoán, tiên lượng, mô tả, hoặc xác định tiến triển của bệnh liên quan đến GCC; để điều biến hoạt tính hoặc chức năng của protein GCC; và để điều trị bệnh liên quan đến GCC như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic được phân lập và/hoặc tái tổ hợp mã hóa các trình tự axit amin của phân tử kháng thể kháng GCC, cũng như các vectơ và các tế bào chủ chứa các axit nucleic này, và các phương pháp sản xuất các phân tử kháng thể kháng GCC.

Tất cả các công bố, các đơn sáng chế, các sáng chế và các tài liệu tham khảo khác được đề cập ở đây được đưa vào bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó.

Các đặc điểm, mục tiêu và các lợi ích khác của (các) sáng chế được bộc lộ ở đây sẽ là rõ ràng từ bản mô tả và các hình vẽ và từ các yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 mô tả sự sinh trưởng khối u trong chuột SCID mang 293-GCC#2 được xử lý bằng 5F9vc-MMAF, -DM1, và -DM4 trên sơ đồ q14d.

Fig. 2 mô tả trọng lượng phổi của chuột được xử lý bằng 0,9%NaCl; kháng thể 209 với 40mg/kg; hoặc kháng thể 5F9 với 10 hoặc 40mg/kg ở ngày 41 p.i.

Fig. 3 mô tả đường cong sống sót của chuột mang khối u CT26-hGCC được xử lý bằng kháng thể 5F9.

Fig. 4 mô tả các thử nghiệm liên kết ELISA để thử nghiệm tính phản ứng chéo kháng thể của thể tương đồng có chung nguồn gốc (orthologs) của GCC.

Mô tả chi tiết sáng chế

Guanylyl Xyclaza C

Guanylyl xyclaza C (GCC) (cũng được biết là STAR, Thụ thể ST, GUC2C, và GUCY2C) là thụ thể bề mặt tế bào xuyên màng có chức năng duy trì dịch lỏng trong đường ruột, ổn định nội mô chất điện phân và tăng sinh tế bào (Carrithers et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3018-3020 (2003); Mann et al., *Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-466 (1997); Pitari et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2695-2699 (2003)); Số lưu giữ của GenBank NM_004963, mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Chức năng này gián tiếp thông qua liên kết của guanylin (Wiegand et al. *FEBS Lett.* 311:150-154 (1992)). GCC cũng là thụ thể cho độc tố ruột ổn nhiệt (ST, ví dụ, có trình tự axit amin là NTFYCCELCNPACAGCY, SEQ ID NO:316) là peptit được sản xuất bởi *E. coli*, cũng như các sinh vật nhiễm bệnh khác (Rao, M.C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93 (1985); Knoop F.C. và Owens, M. *J. Pharmacol.*

Toxicol. Methods 28:67-72 (1992)). Liên kết của ST với GCC hoạt hóa chuỗi tín hiệu mà gây ra bệnh về đường ruột, ví dụ, bệnh tiêu chảy.

Trình tự nucleotit cho GCC người (Số lưu giữ của GenBank NM_004963):

```

1      atgaagacgt tgctgttgga cttggccttg tggcactgc tctccagcc cgggtggctg
61     tccttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg
121    atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggaagatgc ggtgaatgag
181    gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct
241    actttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt
301    gaaggcctcg acctactcag gaaaatttca aatgcacaac ggtgggctg tgtctcata
361    gggccctcat gtacatactc caccttcag atgtacctg acacagaatt gagctacccc
421    atgatctcag ctggaagttt tggattgtca tgtactata aagaaacctt aaccaggctg
481    atgtctccag ctagaaagt gatgtacttc ttggttaact ttggaaaac caacgatctg
541    ccttcaaaa ctattcctg gagcacttcg tatgtttaca agaattgtac agaaactgag
601    gactgtttct ggtaccttaa tgctctggag gctagcgtt cctattctc ccacgaactc
661    ggctttaagg tgggttaag acaagataag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac
721    aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tctctacaa gctgaagggt
781    gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atctttcaa tgaccagtac
841    ttgaggaca atgtcacagc cctgactat atgaaaaatg tcctgttct gacgctgtct
901    cctgggaatt ccttctaaa tagctcttcc tccaggaatc taccaccaac aaaacgagac
961    ttgctcttg cctatttgaa tggaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt
1021   gaaaatggag aaaatattac ccccccaaa ttgctcatg cttcaggaa tctcactttt
1081   gaagggtatg acggtccagt gacctggat gactgggggg atgttgacag taccatggtg
1141   cttctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaagggtc tttgacctg tgataccac
1201   gtaaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca cttggaagaa ctctaaactt
1261   cctaatagata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact
1321   ggagctgtgg tgctgctcct gctcgtcgtc ctctgatgc tcagaaaata tagaaaagat
1381   tatgaacttc gtcagaaaaa atgggtccac attcctcctg aaaatatctt tctctggag
1441   accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc
1501   cagagactac gacagtgcaa atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac
1561   aatgatggta atttactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac
1621   tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat ctccggggtg
1681   atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttaa atgacacaat ttctaccct

```

1741 gatggcacat tcatggattg ggagtftaag atctctgtct tgtatgacat tgctaaggga
 1801 atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc
 1861 gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaattc cattttacat
 1921 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa
 1981 ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tcctgcggaa agaaaccttc
 2041 tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gaggggaaaa ttccaatgga
 2101 atgaaaccct tccgccaga tttattcttg gaaacagcag agggaaaaaga gctagaagtg
 2161 tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga ttcaaaaaa
 2221 attgagacta cacttgccaa gatatttga cttttcatg accaaaaaaa tgaaagctat
 2281 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag
 2341 gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatgttg
 2401 cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat
 2461 gaggaagtta caatctactt cagtgcatt gtaggtttca ctactatctg caaatacagc
 2521 acccccatgg aagtgggtga catgcttaat gacatctata agagttttga ccacattgt
 2581 gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcggatg cgtacatggg ggctagtggg
 2641 ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc
 2701 ctcagcttca tggggacctt tgagctggag catcttctg gcctcccaat atggattcgc
 2761 attggagttc actctggtcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat
 2821 tgtctatttg gagatacggg caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctcccttg
 2881 agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt
 2941 tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg
 3001 actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaaccctc ctactgtgga gaatcaacag
 3061 cgtttgcaag cagaattttc agacatgatt gccaactctt tacagaaaag acaggcagca
 3121 gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac
 3181 ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctatttt aa

(SEQ ID NO:227)

Trình tự axit amin cho GCC người (Số lưu giữ của GenPept No. NP_004954):

1 mktllldlal wslfqpgwl sfssqvsqnc hngsyaisvl mmgnsafaep lknledavne
 61 gleivrglrlq naglnvtvna tfmysdglh nsgdcrrstc egldllrkis naqrmgcvli
 121 gpsctystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktncl
 181 pfktyswsts yvykngtete dcfwylnale asvsyfshel gfkvvlrqdk efqdlmdhn
 241 rksnviimcg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvlvltls

301 pgnslInssf srnlspkrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafnltf
 361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdmv ptftwnskl
 421 pnditgrgpq ilmiavftlt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
 481 tnetnhvslk idddkrrdti qlrqckydk krvilkdikh ndgnftekkq ielnkllqid
 541 yynltkfygt vkldtmifgv ieycerslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
 601 msylhsskte vhgrrkstnc vvdsrmvki tdfgensilp pkkdltwape hlrqanisqk
 661 gdvysygiia qeillrketf ytlscrdrne kifrvnsng mkpfrpdlfl etaeeklev
 721 yllvknwwee dpekrpdfkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysrnlehlve
 781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvkslk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys
 841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lprkngnrha idiakmalei
 901 lsfmgtfele hlpglpiwir igvhsgpcaa gvgikmpy clfgdtvnta smestglpl
 961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq
 1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprrv asykkgtley lqlnttdkes tyf
 (SEQ ID NO:228)

Protein GCC có một số miền đã được chấp nhận thông thường, mỗi miền này đóng góp một chức năng riêng biệt cho phân tử GCC. Các phần của GCC bao gồm trình tự tín hiệu (để điều khiển protein này với bề mặt tế bào) từ gốc axit amin 1 đến khoảng gốc 23, hoặc gốc 1 đến khoảng gốc 21 của SEQ ID NO:228 (được cắt bỏ cho sự thành thực để thu được protein thành thực có chức năng từ khoảng các gốc axit amin từ 22 hoặc 24 đến 1073 của SEQ ID NO:228), miền ngoại bào cho phối tử, ví dụ, guanylin hoặc ST, liên kết từ khoảng gốc axit amin 24 đến khoảng gốc 420, hoặc từ khoảng gốc 54 đến khoảng gốc 384 của SEQ ID NO:228, miền xuyên màng từ khoảng gốc axit amin 431 đến khoảng gốc 454, hoặc từ khoảng gốc 436 đến khoảng gốc 452 của SEQ ID NO:228, miền tương đồng kinaza, được dự đoán có hoạt tính tyrosin kinaza từ khoảng gốc axit amin 489 đến khoảng gốc 749, hoặc từ khoảng gốc 508 đến khoảng gốc 745 của SEQ ID NO:228 và miền xúc tác guanylyl xyclaza từ khoảng gốc 750 đến khoảng gốc 1007, hoặc từ khoảng gốc 816 đến khoảng gốc 1002 của SEQ ID NO:228.

Trong các mô người bình thường, GCC được biểu hiện ở các tế bào niêm mạc, ví dụ, ở các màng rìa bàn chải đỉnh sụn phễu, lớp lót ruột non, ruột già và trực tràng (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). Sự biểu hiện GCC được duy trì khi sự biến đổi thành khối u của các tế bào biểu mô ruột, với sự biểu hiện trong tất

cả các khối u đại trực tràng nguyên phát và di căn (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994)). Các tế bào khối u từ dạ dày, thực quản và điểm nối dạ dày-thực quản cũng biểu hiện GCC (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,767,704; Debruyne et al. *Gastroenterology* 130:1191-1206 (2006)). Sự biểu hiện đặc hiệu mô và liên quan đến ung thư, ví dụ, có nguồn gốc từ dạ dày-ruột non, (ví dụ, ung thư ruột kết, ung thư dạ dày, hoặc ung thư thực quản), có thể được khai thác để sử dụng GCC làm dấu chuẩn chẩn đoán cho bệnh này (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005)).

Là protein bề mặt tế bào, GCC cũng có thể đóng vai trò là đích chữa bệnh cho các protein liên kết thụ thể như các kháng thể hoặc các phối tử. Trong mô ruột bình thường, GCC được biểu hiện bên phía đỉnh sụn phễu của các đường nối kín tế bào biểu mô mà tạo thành màng ngăn không thấm giữa môi trường khoang và ngăn mạch (Almenoff et al., *Mol Microbiol* 8: 865-873); Guarino et al., *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026 (1987)). Được hiểu là, dùng trong tĩnh mạch toàn thân, liệu pháp protein gắn kết với GCC sẽ có hiệu quả rất nhỏ lên các thụ thể GCC của ruột, trong khi đã có sự tiếp cận với các tế bào khối u của hệ dạ dày-ruột non, bao gồm các tế bào ung thư ruột kết xâm chiếm hoặc di căn, các khối u ruột kết di căn hoặc bên ngoài ruột non, các khối u thực quản hoặc các khối u dạ dày, ung thư tuyến ở điểm nối dạ dày-thực quản. Hơn nữa, GCC nội nhập thông qua sự nhập nội bào qua trung gian thụ thể nhờ sự gắn kết với phối tử (Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995)).

Các kháng thể đa dòng gây ra sự kháng vùng ngoại bào của GCC (Nandi et al. *Protein Expr. Purif.* 8:151-159 (1996)) có khả năng ức chế liên kết peptit ST với GCC người và chuột cống và ức chế sự sản sinh cGMP qua trung gian ST bởi GCC người.

GCC đã được mô tả là protein tham gia vào các bệnh ung thư bao gồm ung thư ruột kết. Cũng xem, Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995). Các liệu pháp phân tử kháng thể hướng đến GCC có thể được sử dụng riêng rẽ ở dạng không tiếp hợp để nhờ đó ức chế các tế bào ung thư biểu hiện GCC. Các phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể liên kết với GCC người. Theo một số phương án, các phân

tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể ức chế liên kết của phổi tử, ví dụ, guanylin hoặc độc tố ruột ổn nhiệt với GCC. Theo các phương án khác, các phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế không ức chế liên kết của phổi tử, ví dụ, guanylin hoặc độc tố ruột ổn nhiệt với GCC.

Các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với GCC bao gồm GCC:B10 (Nandi et al., *J. Cell. Biochem.* 66:500-511 (1997)), GCC:4D7 (Vijayachandra et al. *Biochemistry* 39:16075-16083 (2000)) và GCC:C8 (Bakre et al. *Eur. J. Biochem.* 267:179-187 (2000)). GCC:B10 có chuỗi nhẹ kappa và isotyp IgG2a và phản ứng chéo với GCC của chuột cống, lợn và khỉ. GCC:B10 liên kết với 63 axit amin đầu tiên của vùng nội bào của GCC, cụ thể là với các gốc 470-480 của SEQ ID NO:228 (Nandi et al. *Protein Sci.* 7:2175-2183 (1998)). GCC:4D7 liên kết với vùng tương đồng kinaza, trong các gốc từ 491-568 của GCC (Bhandari et al. *Biochemistry* 40:9196-9206 (2001)). GCC:C8 liên kết với vùng giống protein kinaza trong phần bào chất của GCC.

Các định nghĩa và phương pháp

Trừ khi được định nghĩa khác ở đây, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng liên quan đến sáng chế có nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Nhìn chung, thuật ngữ được sử dụng liên quan, và các kỹ thuật về nuôi cấy mô và tế bào, sinh học phân tử, và hóa học protein và oligo- hoặc polynucleotit và lai được mô tả ở đây là các kỹ thuật được biết trong lĩnh vực. Các số hiệu lưu giữ GenBank hoặc GenPept và các axit nucleic và các trình tự peptit hữu ích có thể được tìm thấy trên website được lưu giữ bởi Trung tâm Quốc gia về Thông tin Công nghệ sinh học (National Center for Biotechnological Information, Bethesda MD). Các kỹ thuật chuẩn được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, và nuôi cấy mô và sự biến nạp và sự chuyển nhiễm (ví dụ, điện chuyển, chuyển nhiễm liposom). Các phản ứng enzym và các kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo hướng dẫn kỹ thuật của nhà sản xuất hoặc như được thực hiện thông thường trong lĩnh vực hoặc như được mô tả ở đây. Các kỹ thuật và các quy trình đề cập trước đó thường được thực hiện theo các phương pháp được biết trong lĩnh vực, ví dụ, như được mô tả trong các tài liệu tham khảo chung và chuyên ngành hơn mà được viện dẫn và thảo luận kỹ trong bản mô tả sáng chế này. xem ví dụ, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, N.Y. (2000)) hoặc see generally, Harlow, E. và Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Các thuật ngữ được sử dụng liên quan, và các quy trình thí nghiệm và các kỹ thuật về hóa học phân tích, hóa học hữu cơ tổng hợp, và thuốc và hóa dược được mô tả ở đây được biết trong lĩnh vực. Các kỹ thuật chuẩn được sử dụng cho các tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, bào chế dược phẩm, chế phẩm, và phân phối, và điều trị cho người bệnh. Hơn nữa, trừ khi được yêu cầu khác bởi ngữ cảnh, các thuật ngữ số ít bao gồm cả số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm cả số ít.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân tử kháng thể” đề cập đến kháng thể, (các) peptit kháng thể hoặc globulin miễn dịch, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, của kháng thể. Các phân tử kháng thể bao gồm các phân tử kháng thể chuỗi đơn, ví dụ, scFv, xem ví dụ, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; và Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883), và các phân tử kháng thể miễn đơn, xem, ví dụ, WO9404678. Mặc dù không nằm trong thuật ngữ “phân tử kháng thể” sáng chế cũng bao gồm “(các) chất tương tự kháng thể,” các khung protein của các phân tử không phải kháng thể khác, ví dụ, các protein dung hợp và/hoặc các thể liên hợp miễn dịch sử dụng các CDR để tạo nên sự liên kết kháng nguyên đặc hiệu.

“Phân tử kháng thể kháng GCC” đề cập đến phân tử kháng thể (nghĩa là, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể hoặc chất tương tự kháng thể) mà tương tác với hoặc nhận biết, ví dụ, gắn kết (ví dụ, gắn kết đặc hiệu) với GCC, ví dụ, GCC người. Các phân tử kháng thể kháng GCC điển hình là như các phân tử được tóm tắt trong Bảng 1 và 2.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể,” “(các) peptit kháng thể” hoặc “globulin miễn dịch” đề cập đến các protein và glycoprotein chuỗi đơn, chuỗi kép, và đa chuỗi. Thuật ngữ kháng thể bao gồm kháng thể đa dòng, đơn dòng, khảm, ghép CDR và người hoặc làm cho giống như của người, tất cả các thuật ngữ này được thảo luận chi tiết hơn ở đây. Cũng được bao gồm trong thuật ngữ này là các kháng thể camelid, xem, ví dụ, US2005/0037421, và thể nano, ví dụ, IgNAR (các kháng thể cá mập), xem, ví dụ, WO03/014161. Thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm các biến thể được cải biến di truyền và tổng hợp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mảnh kháng thể” hoặc “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể đề cập đến, ví dụ, đến các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, các kháng thể chuỗi đơn, các kháng thể chuỗi nặng có chức năng (các thể nanobody), cũng như phần bất kỳ của kháng thể có tính đặc hiệu về phía ít nhất một epitop mong muốn, mà cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn về liên kết đặc hiệu (ví dụ, mảnh có các trình tự CDR đầy đủ và có các trình tự khung đầy đủ để liên kết đặc hiệu với epitop). Ví dụ, mảnh gắn kết kháng nguyên có thể cạnh tranh liên kết với epitop liên kết với kháng thể mà mảnh này có nguồn gốc từ đó. Có nguồn gốc, như được sử dụng trong ngữ cảnh này và tương tự, không ngụ ý đến phương pháp hoặc quá trình thu được cụ thể bất kỳ, nhưng có thể chỉ đề cập đến sự tương đồng trình tự. Các mảnh gắn kết kháng nguyên có thể được sản xuất bằng các kỹ thuật tái tổ hợp, hoặc bằng sự phân giải bằng enzym hoặc hóa học kháng thể nguyên vẹn. Thuật ngữ, mảnh gắn kết kháng nguyên, khi được sử dụng với chuỗi đơn, ví dụ, chuỗi nặng, của kháng thể có chuỗi nặng và nhẹ nghĩa là mảnh của chuỗi này là đủ sao cho khi được bắt cặp với vùng biến đổi hoàn chỉnh của chuỗi khác, ví dụ, chuỗi nhẹ, sẽ cho phép liên kết ít nhất 25, 50, 75, 85 hoặc 90% trình tự được quan sát với toàn bộ vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ.)

Thuật ngữ, “cụm CDR gắn kết kháng nguyên” hoặc “số CDR đủ để cho phép gắn kết” (và cách nói tương tự), như được sử dụng ở đây, đề cập đến các CDR đầy đủ của chuỗi, ví dụ, chuỗi nặng, sao cho khi được đặt trong khung và được bắt cặp với vùng biến đổi hoàn chỉnh của chuỗi kia, hoặc với phần của vùng biến đổi của chuỗi kia có chiều dài tương tự và có số CDR giống nhau, ví dụ, chuỗi nhẹ, sẽ cho phép liên kết, ví dụ, ít nhất 25, 50, 75, 85 hoặc 90% trình tự được quan sát với toàn bộ vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể người” bao gồm kháng thể chứa trình tự có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người, như kháng thể có nguồn gốc từ chuột chuyển gen có các gen globulin miễn dịch người (ví dụ, chuột được cải biến di truyền XENOMOUSE™ (Abgenix, Fremont, CA)), thư viện thực khuẩn thể người, các tế bào u tủy ở người, hoặc các tế bào B ở người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể được làm giống như của người” đề cập đến kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể không phải người ví dụ, loài gặm nhấm (ví dụ, chuột) chứa hoặc hầu như chứa các đặc điểm gắn kết kháng nguyên của

kháng thể gốc ban đầu nhưng có tính sinh miễn dịch kém hơn ở người. Được làm giống như của người như được sử dụng ở đây nhằm để bao gồm các kháng thể đã được loại bỏ miễn dịch. Thường là các kháng thể được làm giống như của người bao gồm các CDR không phải của người và các khung và các vùng hằng định có nguồn gốc từ người hoặc của người.

Thuật ngữ kháng thể “được cải biến”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân tách bằng phương pháp tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào trong tế bào chủ, các kháng thể được phân tách từ thư viện kháng thể tổ hợp, tái tổ hợp, các kháng thể được phân tách từ động vật (ví dụ, chuột, cừu hoặc dê) chuyển gen các gen globulin miễn dịch của người hoặc các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân tách bằng phương pháp khác bất kỳ bao gồm nối các trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự ADN khác. Các kháng thể được cải biến này bao gồm các kháng thể được làm giống như của người, được ghép CDR (ví dụ, kháng thể có các CDR từ kháng thể thứ nhất và vùng khung từ nguồn khác, ví dụ, kháng thể thứ hai hoặc khung liên ứng), khảm, được tạo ra *in vitro* (ví dụ, bằng thực khuẩn thể biểu hiện), và có thể tùy ý bao gồm các vùng biến đổi hoặc ổn định có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người hoặc các gen globulin miễn dịch của người hoặc các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân tách bằng phương pháp bất kỳ bao gồm nối trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự globulin miễn dịch khác. Trong các phương án, phân tử kháng thể được cải biến bao gồm phân tử kháng thể có sự thay đổi trình tự trình tự từ kháng thể tham chiếu.

Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu đơn” đề cập đến kháng thể hoặc chế phẩm kháng thể thể hiện tính đặc hiệu liên kết và ái lực đối với epitop cụ thể. Thuật ngữ này bao gồm “kháng thể đơn dòng” hoặc “chế phẩm kháng thể đơn dòng.”

Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” hoặc “kháng thể hai chức năng” đề cập đến kháng thể thể hiện tính đặc hiệu liên kết kép cho hai epitop, trong đó mỗi vị trí gắn kết khác nhau và nhận biết epitop khác nhau.

Thuật ngữ "kháng thể không tiếp hợp" và "kháng thể trần" được sử dụng hoán đổi cho nhau đề cập đến phân tử kháng thể không được tiếp hợp với gốc không phải kháng thể, ví dụ, dược chất hoặc chất đánh dấu.

Thuật ngữ “thể liên hợp miễn dịch”, “thể liên hợp kháng thể”, “thể liên hợp dược chất kháng thể”, và “ADC” được sử dụng hoán đổi cho nhau và đề cập đến kháng thể được tiếp hợp với gốc không phải kháng thể, ví dụ, dược chất hoặc chất đánh dấu.

Thuật ngữ “chất” được sử dụng ở đây để chỉ hợp chất hóa học, hỗn hợp các hợp chất hóa học, đại phân tử sinh học, hoặc dịch chiết được sản xuất từ các nguyên liệu sinh học. Thuật ngữ “dược chất” đề cập đến chất có hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ “chất chống ung thư” hoặc “chất hóa liệu pháp” được sử dụng ở đây đề cập đến chất có đặc điểm chức năng ức chế sự phát triển hoặc tiến triển khối u ở người, cụ thể là tổn thương ác tính (ung thư), như caxinoma, sacom, u lympho, hoặc ung thư bạch cầu. Sự ức chế sự di căn hoặc sự tạo mạch thường là đặc điểm của chất chống ung thư hoặc chất hóa liệu pháp. Chất hóa liệu pháp có thể là chất gây độc tế bào hoặc kìm tế bào. Thuật ngữ “chất kìm tế bào” đề cập đến chất ức chế hoặc kiềm chế sự sinh trưởng tế bào và/hoặc sự nhân lên của tế bào.

“Các chất gây độc tế bào” đề cập đến hợp chất gây ra sự chết tế bào trước tiên bằng cách gây cản trở trực tiếp đến chức năng của tế bào, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất alkyl hóa, các chất ức chế yếu tố hoại tử khối u, các chất xen vào, các chất ức chế vi cấu trúc hình ống, các chất ức chế kinaza, các chất ức chế proteasom và các chất ức chế topoisomeraza. “Lượng phá vỡ độc tố” như được sử dụng ở đây đề cập đến lượng chất gây độc tế bào đủ mà khi được phân phối cho tế bào dẫn đến gây chết tế bào. Sự phân phối lượng phá vỡ độc tố có thể được thực hiện bằng cách dùng lượng đủ thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế và chất gây độc tế bào. Phân phối lượng phá vỡ độc tố có thể cũng được thực hiện bằng cách dùng lượng đủ thể liên hợp miễn dịch chứa chất gây độc tế bào, trong đó thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể thứ hai hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà nhận biết và gắn kết kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây cụm từ, trình tự “có nguồn gốc từ” hoặc “đặc hiệu đối với trình tự được chỉ định” đề cập đến trình tự chứa trình tự tiếp giáp gồm khoảng ít nhất 6 nucleotit hoặc tương ứng ít nhất 2 axit amin, ít nhất khoảng 9 nucleotit hoặc tương ứng ít nhất 3 axit amin, ít nhất khoảng 10-12 nucleotit hoặc tương ứng 4 axit amin, hoặc ít nhất khoảng 15-21 nucleotit hoặc tương ứng 5-7 axit amin, nghĩa là, giống hoặc bổ trợ với, ví dụ, vùng kề nhau của trình tự được chỉ định. Theo các phương án nhất định, trình tự này chứa tất cả trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin chỉ định. Trình tự này có thể là bổ trợ (trong trường hợp trình tự polynucleotit) hoặc giống với vùng trình tự có liên quan đến trình tự cụ thể như được xác định bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Các vùng mà các trình tự có thể có nguồn gốc, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các vùng mã hóa các epitop đặc hiệu, các vùng mã hóa các CDR, các vùng mã hóa các trình tự vùng khung, các vùng mã hóa các vùng miền ổn định, các vùng mã hóa các vùng biến đổi, cũng như các vùng không dịch mã hoặc không phiên mã. Trình tự có nguồn gốc sẽ không cần thiết có nguồn gốc một cách tự nhiên từ trình tự quan tâm dưới nghiên cứu, nhưng có thể được tạo ra theo phương pháp bất kỳ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, sự tổng hợp hóa học, sự sao chép, sự phiên mã ngược hoặc sự phiên mã được dựa trên thông tin được cung cấp bởi trình tự gồm các bazơ trong (các) vùng mà polynucleotit có nguồn gốc. Được hiểu là, nó có thể là sự định hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa của polynucleotit ban đầu. Ngoài ra, các sự kết hợp của các vùng tương ứng với vùng của trình tự được chỉ định có thể được cải biến hoặc được kết hợp theo cách được biết trong lĩnh vực là phù hợp với chủ định sử dụng. Ví dụ, trình tự có thể chứa hai hoặc nhiều trình tự kề nhau mà mỗi trình tự chứa một phần trình tự chỉ định, và bị ngắt quãng bằng vùng mà không giống với trình tự chỉ định nhưng nhằm mô tả trình tự có nguồn gốc từ trình tự chỉ định. Về các phân tử kháng thể, “có nguồn gốc từ” bao gồm phân tử kháng thể có liên quan về mặt chức năng hoặc cấu trúc với kháng thể so sánh, ví dụ, “có nguồn gốc từ” bao gồm phân tử kháng thể có trình tự hoặc cấu trúc giống hoặc hầu như giống, ví dụ, có các CDR, vùng khung hoặc các vùng biến đổi giống hệt hoặc tương tự. “Có nguồn gốc từ” cho kháng thể cũng bao gồm các gốc, ví dụ, một hoặc nhiều, ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc nhiều gốc, có thể hoặc không thể kề nhau, nhưng được định nghĩa hoặc xác định theo sơ đồ đánh số hoặc tương đồng với cấu trúc kháng thể chung hoặc sự gần gũi kích thước ba chiều, nghĩa là, trong CDR hoặc vùng khung, của trình tự so sánh. Thuật ngữ

“có nguồn gốc từ” không bị giới hạn đến có nguồn gốc tự nhiên từ nhưng bao gồm sự tạo ra bằng phương pháp bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng thông tin trình tự từ kháng thể so sánh để thiết kế kháng thể khác.

Như được sử dụng ở đây, cụm từ “được mã hóa bởi” đề cập đến trình tự axit nucleic mã hóa trình tự polypeptit, trong đó trình tự polypeptit hoặc phần của nó chứa trình tự axit amin gồm ít nhất từ 3 đến 5 axit amin, ít nhất từ 8 đến 10 axit amin, hoặc ít nhất từ 15 đến 20 axit amin từ polypeptit được mã hóa bởi trình tự axit nucleic này.

Tính toán “sự tương đồng” giữa hai trình tự có thể được thực hiện như sau. Các trình tự này được duỗi thẳng cho mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khoảng trống có thể được đưa vào trong một hoặc cả hai trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ nhất và thứ hai để duỗi thẳng tối ưu và các trình tự không tương đồng có thể được quan tâm vì mục đích so sánh). Chiều dài của trình tự tham chiếu được duỗi thẳng cho mục đích so sánh ít nhất là 30%, 40%, hoặc 50%, ít nhất là 60%, hoặc ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 100% chiều dài trình tự tham chiếu. Các gốc axit amin hoặc nucleotit ở các vị trí axit amin hoặc nucleotit sau đó được so sánh. Khi vị trí trong trình tự thứ nhất được chiếm giữ bởi gốc axit amin hoặc nucleotit tương tự như vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, thì hai phân tử này là giống nhau ở vị trí đó (như được sử dụng ở đây “sự giống” axit amin hoặc axit nucleic là tương đương với “sự tương đồng” axit amin hoặc axit nucleic). Phần trăm giống giữa hai trình tự là hàm về số vị trí giống nhau cùng có trong các trình tự này, kể cả số các khoảng trống, và chiều dài mỗi khoảng trống, mà cần được đưa vào để duỗi thẳng tối ưu hai trình tự.

So sánh các trình tự và xác định phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể được thực hiện sử dụng thuật toán toán học. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, thuật toán Needleman và Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970), đã được đưa vào trong chương trình GAP trong gói phần mềm GCG, sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, và trọng số khoảng trống là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng số độ dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự nucleotit có thể cũng được xác định sử dụng chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (Accelrys, Inc. San Diego, CA), sử dụng ma trận NWSgapdna.CMP và trọng số khoảng trống là 40, 50, 60, 70, hoặc 80 và trọng số độ dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Bộ các thông số điển hình để xác định sự tương đồng là ma trận ghi điểm Blossum 62 với

điểm phạt cho khoảng trống là 12, điểm phạt cho kéo dài khoảng trống là 4, và điểm phạt cho khoảng trống dịch chuyển khung là 5.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt” mô tả các điều kiện lai và rửa. Hướng dẫn để thực hiện các phản ứng lai có thể được tìm thấy trong *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Phương pháp chứa nước và không chứa nước được mô tả trong tài liệu này và có thể sử dụng một trong hai. Các điều kiện lai cụ thể được đề cập đến ở đây là như sau: 1) các điều kiện lai nghiêm ngặt thấp trong 6X natri clorua/natri xitrat (SSC) ở khoảng 45°C, sau đó rửa hai lần trong 0,2X SSC, 0,1% SDS ít nhất ở 50°C (nhiệt độ các lần rửa có thể được gia tăng đến 55°C cho các điều kiện nghiêm ngặt thấp); 2) các điều kiện lai nghiêm ngặt trung bình trong 6X SSC ở khoảng 45°C, sau đó rửa một hoặc nhiều lần trong 0,2X SSC, 0,1% SDS ở 60°C; 3) các điều kiện lai nghiêm ngặt cao trong 6X SSC ở khoảng 45°C, sau đó rửa một hoặc nhiều lần trong 0,2X SSC, 0,1% SDS ở 65°C; và 4) các điều kiện lai độ nghiêm ngặt rất cao là 0,5M natri phosphat, 7% SDS ở 65°C, sau đó rửa một hoặc nhiều lần ở 0,2X SSC, 1% SDS ở 65°C. Các điều kiện nghiêm ngặt rất cao (4) thường là các điều kiện ưu tiên và các điều kiện nên được sử dụng trừ khi được chỉ rõ khác.

Được hiểu rằng các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có các sự thay thế axit amin không quan trọng hoặc bảo toàn bổ sung, không gây ảnh hưởng đáng kể đến các chức năng của polypeptit. Dù sự thay thế cụ thể sẽ được dung nạp hay không, nghĩa là, sẽ không gây ảnh hưởng bất lợi đến các đặc điểm sinh học mong muốn, như hoạt tính gắn kết, có thể được xác định như được mô tả trong Bowie, JU et al. *Science* 247:1306-1310 (1990) hoặc Padlan et al. *FASEB J.* 9:133-139 (1995). “Sự thay thế axit amin bảo toàn” là sự thay thế, trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương tự. Họ các gốc axit amin có các chuỗi bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực này. Các họ này bao gồm axit amin có chuỗi bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), chuỗi bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), chuỗi bên phân cực không tích điện (ví dụ, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), chuỗi bên không phân cực (ví dụ, glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), các chuỗi

phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và các chuỗi mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin).

Gốc axit amin “không quan trọng” là gốc mà có thể được thay đổi từ trình tự kiểu đại của chất gắn kết, ví dụ, kháng thể không bị mất hoặc hầu như không bị thay đổi hoạt tính sinh học, trong khi gốc axit amin “quan trọng” dẫn đến thay đổi kháng thể này. Trong kháng thể, gốc axit amin quan trọng có thể là gốc xác định tính đặc hiệu (specificity determining residue-SDR).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được phân tách” đề cập đến nguyên liệu mà bị loại khỏi môi trường ban đầu của nó (ví dụ, môi trường tự nhiên nếu nó có trong tự nhiên). Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có trong tự nhiên có mặt trong động vật sống không được phân tách, nhưng polynucleotit hoặc ADN hoặc polypeptit tương tự được tách từ một số hoặc tất cả các nguyên liệu cùng tồn tại trong hệ thống tự nhiên, được phân tách. Polynucleotit này có thể là một phần của vector và/hoặc polynucleotit hoặc polypeptit này có thể là một phần của chế phẩm, ví dụ, hỗn hợp, dung dịch hoặc huyền phù hoặc chứa tế bào được phân tách hoặc tế bào được nuôi cấy mà chứa polynucleotit hoặc polypeptit này, và vẫn được phân tách vì vector hoặc chế phẩm này không phải là một phần của môi trường tự nhiên của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đơn vị sao chép” (replicon) đề cập đến yếu tố di truyền bất kỳ, như plasmid, nhiễm sắc thể hoặc virus, mà hoạt động như một đơn vị tự sao chép polynucleotit trong tế bào.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết linh hoạt” đề cập đến tình huống trong đó các thành phần được mô tả là nằm trong mối quan hệ cho phép chúng hoạt động chức theo cách chủ định. Do đó, ví dụ, trình tự điều khiển “được liên kết linh hoạt” với trình tự mã hóa được nối theo cách sao cho sự biểu hiện trình tự mã hóa thu được dưới các điều kiện tương thích với trình tự điều khiển.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến đơn vị sao chép trong đó mảnh polynucleotit khác được gắn với, như để tạo nên sự sao chép và/hoặc biểu hiện mảnh được gắn này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự điều khiển” đề cập đến trình tự polynucleotit mà là cần thiết để thực hiện việc biểu hiện trình tự mã hóa mà nó được gắn vào. Bản chất của các tự điều khiển này khác nhau phụ thuộc vào sinh vật chủ.

Trong tế bào chưa có nhân điển hình, các trình tự điều khiển này thường bao gồm trình tự khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom và trình tự kết thúc phiên mã, và trong một số trường hợp, các trình tự tăng cường. Thuật ngữ “trình tự điều khiển” do đó nhằm đề bao gồm tất cả các thành phần tối thiểu mà sự có mặt của nó là cần thiết cho sự biểu hiện, và cũng bao gồm các thành phần bổ sung mà sự có mặt của nó là hữu ích, ví dụ, các trình tự dẫn đầu.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sản phẩm tinh khiết” đề cập đến việc điều chế sản phẩm mà đã được phân tách từ các thành phần cấu thành tế bào, sản phẩm này thường có liên quan với thành phần cấu thành tế bào này và/ hoặc từ các loại tế bào khác có thể có trong mẫu quan tâm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “epitop” đề cập đến protein quyết định khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng thể. Các yếu tố xác định epitop thường gồm các nhóm phân tử bề mặt có hoạt tính hóa học như các chuỗi bên axit amin hoặc đường và thường có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc hiệu, cũng như các đặc điểm tích điện đặc hiệu. Một số epitop là các epitop tuyến tính trong khi các epitop khác là các epitop cấu hình. Epitop tuyến tính là epitop trong đó trình tự bậc một axit amin kề nhau chứa epitop được nhận biết. Epitop tuyến tính thường bao gồm ít nhất 3, và thông thường hơn, ít nhất 5, ví dụ, khoảng từ 8 đến 10 axit amin kề nhau. Epitop cấu hình có thể thu được từ ít nhất hai tình huống, như: a) trình tự tuyến tính mà chỉ được tiếp xúc với liên kết kháng thể trong các cấu hình protein nhất định, ví dụ, phụ thuộc vào liên kết phối tử, hoặc phụ thuộc vào sự cải biến (ví dụ, sự phosphoryl hóa) bằng các phân tử tín hiệu; hoặc b) kết hợp các đặc điểm cấu trúc từ nhiều hơn một phần protein, hoặc trong các protein đa tiểu đơn vị, từ nhiều hơn một tiểu đơn vị, trong đó các đặc điểm này là trong khoảng cách gần đủ trong không gian 3 chiều để tham gia vào trong liên kết.

Như được sử dụng ở đây, “isotyp” đề cập đến lớp kháng thể (ví dụ, IgM hoặc IgG1) được mã hóa bởi các gen vùng hằng định chuỗi nặng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất phát hiện được” “chất đánh dấu” hoặc “được đánh dấu” được sử dụng để đề cập đến sự kết hợp của chất đánh dấu phát hiện được trên polypeptit hoặc glycoprotein. Nhiều phương pháp khác nhau để đánh dấu polypeptit và glycoprotein được biết trong lĩnh vực và có thể được sử dụng. Các ví dụ về các chất đánh dấu polypeptit bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất sau: các

đồng vị phóng xạ hoặc các nhân phóng xạ (ví dụ, indi (^{111}In), iot (^{131}I hoặc ^{125}I), yttri (^{90}Y), luteti (^{177}Lu), actini (^{225}Ac), bismuth (^{212}Bi hoặc ^{213}Bi), lưu huỳnh (^{35}S), cacbon (^{14}C), triti (^3H), rhodi (^{188}Rh), techneti ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), praseodymi, hoặc phospho (^{32}P) hoặc nhân phóng xạ phát positron, ví dụ, cacbon-11 (^{11}C), kali-40 (^{40}K), ni tơ-13 (^{13}N), ôxy-15 (^{15}O), flo-18 (^{18}F), và iot-121 (^{121}I)), các chất đánh dấu huỳnh quang (ví dụ, FITC, rhodamin, lantanit phospho), các chất đánh dấu enzym (ví dụ, peroxidaza cây cải ngựa, beta-galactosidaza, luxiferaza, phosphataza kiềm), các chất hóa phát quang, các nhóm biotinyl (mà có thể được phát hiện bằng avidin được đánh dấu, ví dụ, phân tử chứa gốc streptavidin và các dấu chuẩn huỳnh quang hoặc hoạt tính enzym mà có thể được phát hiện bằng phương pháp quang học hoặc đo nhiệt lượng), và các epitop polypeptit xác định trước được nhận biết bằng chất thông báo thứ hai (ví dụ, trình tự kiểu khóa kéo leuxin, các vị trí gắn kết cho kháng thể thứ hai, các miền liên kết kim loại, các đuôi epitop). Theo một số phương án, các chất đánh dấu được gắn bằng các nhánh đệm có chiều dài khác nhau để giảm sự cản trở không gian tiềm tàng.

Như được sử dụng ở đây, “gắn kết đặc hiệu,” “gắn kết một cách đặc hiệu” hoặc “sự đặc hiệu gắn kết” nghĩa là, đối với các phân tử kháng thể kháng GCC, phân tử kháng thể này liên kết với GCC, ví dụ, protein GCC người, với ái lực cao hơn so với ái lực của nó liên kết với protein không phải GCC, ví dụ, BSA. Thông thường là phân tử kháng GCC sẽ có K_d đối với protein không phải GCC, ví dụ, BSA, là lớn hơn 2, lớn hơn 10, lớn hơn 100, lớn hơn 1.000 lần, lớn hơn 10^4 , lớn hơn 10^5 , hoặc lớn hơn 10^6 lần so với K_d của nó đối với GCC, ví dụ, protein GCC người. Để xác định K_d , K_d đối với protein GCC và không phải GCC, ví dụ, BSA, nên được thực hiện dưới các điều kiện giống nhau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều trị” hoặc “sự điều trị” được xác định là dùng các phân tử kháng thể kháng GCC cho đối tượng, ví dụ, người bệnh, hoặc dùng, ví dụ, bằng cách sử dụng cho mô hoặc tế bào phân tách từ đối tượng mà được đưa quay lại cho đối tượng này. Phân tử kháng thể kháng-GCC có thể được dùng riêng rẽ hoặc kết hợp với chất thứ hai. Điều trị có thể là chữa bệnh, làm lành, làm thuyên giảm, làm dịu bớt, làm thay đổi, làm giảm bệnh, cải thiện, làm nhẹ bớt, trở nên tốt hơn hoặc gây ảnh hưởng đến rối loạn, các triệu chứng của rối loạn hoặc tổ bầm về rối loạn này, ví dụ, bệnh ung thư. Trong khi không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, việc điều trị được cho là gây ra ức chế, sự bong tách, hoặc giết tế bào *in vitro* hoặc *in vivo*, hoặc

nếu không thì giảm khả năng của tế bào, ví dụ, tế bào khác thường, để làm thuyên giảm rối loạn, ví dụ, rối loạn như được mô tả ở đây (ví dụ, bệnh ung thư).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” nhằm để bao gồm động vật có vú, linh trưởng, người và động vật không phải người. Ví dụ, đối tượng có thể là bệnh nhân (ví dụ, bệnh nhân người hoặc động vật có xương sống), bị bệnh ung thư, ví dụ, có nguồn gốc dạ dày ruột (ví dụ, ung thư ruột kết), các triệu chứng của bệnh ung thư, ví dụ, có nguồn gốc dạ dày ruột (ví dụ, ung thư ruột kết), trong đó ít nhất một số tế bào biểu hiện GCC, hoặc tổ bầm về bệnh ung thư, ví dụ, có nguồn gốc dạ dày ruột (ví dụ, ung thư ruột kết), trong đó ít nhất một số tế bào biểu hiện GCC. Thuật ngữ “động vật không phải người” theo sáng chế bao gồm tất cả động vật có xương sống không phải người, ví dụ, động vật có vú không phải người và không phải động vật có vú, như linh trưởng không phải người, cừu, chó, bò, gà, động vật lưỡng cư, động vật bò sát, v.v., trừ khi có quy định khác. Theo một phương án, đối tượng loại trừ một hoặc nhiều hoặc tất cả trong số chuột, chuột cống, thỏ hoặc dê.

Như được sử dụng ở đây, lượng các phân tử kháng thể kháng GCC “hữu hiệu” hoặc “đủ” để điều trị rối loạn, hoặc “lượng hữu hiệu điều trị” hoặc “lượng đủ để điều trị” đề cập đến khối lượng phân tử kháng thể là cho hiệu quả ngay khi dùng đơn liều hoặc đa liều cho đối tượng trong điều trị tế bào, ví dụ, tế bào ung thư (ví dụ, tế bào khối u biểu hiện GCC), hoặc trong điều trị, làm nhẹ bớt, làm thuyên giảm hoặc cải thiện kéo dài đối tượng bị mắc rối loạn như được mô tả ở đây ngoài mong đợi khi không có sự điều trị này. Như được sử dụng ở đây, “ức chế sự tăng trưởng” khối u hoặc bệnh ung thư đề cập đến việc làm chậm, phá vỡ, ngăn chặn hoặc làm ngừng sự tăng trưởng và/hoặc di căn của nó và không nhất thiết cần phải loại bỏ hoàn toàn sự tăng trưởng khối u.

Như được sử dụng ở đây, protein “GCC,” cũng được biết là “STAR”, “GUC2C”, “GUCY2C” hoặc “thụ thể ST” đề cập đến GCC của động vật có vú, ưu tiên là protein GCC của người. GCC của người đề cập đến protein được thể hiện trong SEQ ID NO:228 và các biến thể protein alen có trong tự nhiên của nó. Alen trong SEQ ID NO: 228 có thể được mã hóa bằng trình tự axit nucleic của GCC được thể hiện trong SEQ ID NO:227. Các biến thể khác được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, số lưu giữ Ensp0000261170, Ensembl Database, European Bioinformatics Institute và Wellcome Trust Sanger Institute, có loxin ở gốc 281; SEQ ID NO: 14 của

đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ đã được công bố số US 20060035852; hoặc số truy cập trên Ngân hàng gen (GenBank) AAB19934. Thông thường, biến thể alen có trong tự nhiên có trình tự axit amin ít nhất là giống 95%, 97% hoặc 99% với trình tự GCC của trình tự nêu trong SEQ ID NO:228. Sản phẩm phiên mã mã hóa sản phẩm protein có 1073 axit amin, và được mô tả trong Số truy cập của Ngân hàng gen: NM_004963. Protein GCC được mô tả là protein thụ thể bề mặt tế bào xuyên màng, và được cho là đóng vai trò chủ chốt trong việc duy trì dịch lỏng trong ruột, ổn định nội mô chất điện phân và tăng sinh tế bào.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “alkyl” đề cập đến hydrocarbon mạch phân nhánh hoặc thẳng bão hòa có khoảng từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon (và tất cả sự kết hợp và sự kết hợp phụ của các loại và các số nguyên tử cacbon cụ thể ở đây), nằm trong khoảng từ 1 đến 8 nguyên tử cacbon được ưu tiên. Các ví dụ về các nhóm alkyl là metyl, etyl, *n*-propyl, *iso*-propyl, *n*-butyl, *iso*-butyl, *sec*-butyl, *tert*-butyl, *n*-pentyl, 2-pentyl, 3-pentyl, 2-metyl-2-butyl, *n*-hexyl, *n*-heptyl, *n*-octyl, *n*-nonyl, *n*-dexyl, 3-metyl-2-butyl, 3-metyl-1-butyl, 2-metyl-1-butyl, 1-hexyl, 2-hexyl, 3-hexyl, 2-metyl-2-pentyl, 3-metyl-2-pentyl, 4-metyl-2-pentyl, 3-metyl-3-pentyl, 2-metyl-3-pentyl, 2,3-dimetyl-2-butyl, và 3,3-dimetyl-2-butyl.

Các nhóm alkyl, dù là riêng biệt hoặc là một phần của nhóm khác, có thể được đề cập là “được thế.” Nhóm alkyl được thế là nhóm alkyl mà được thế bằng một hoặc nhiều nhóm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 3 nhóm (và các phần tử thế bổ sung bất kỳ được chọn từ halogen), bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -halogen, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ và -CN, trong đó mỗi R' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc -aryl, và trong đó các nhóm -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, và -C₂-C₈ alkynyl này có thể được tùy ý thế tiếp bằng một hoặc nhiều nhóm bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -halogen, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -

$N(R'')_2$ và $-CN$, trong đó mỗi R'' độc lập được chọn từ $-H$, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_2-C_8$ alkenyl, $-C_2-C_8$ alkynyl, hoặc $-aryl$.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “alkenyl” và “alkynyl” đề cập đến chuỗi cacbon mạch thẳng và phân nhánh có khoảng từ 2 đến 20 nguyên tử cacbon (và tất cả các sự kết hợp và các sự kết hợp phụ của các loại và các số nguyên tử cacbon cụ thể ở đây), với khoảng từ 2 đến 8 nguyên tử cacbon là được ưu tiên. Chuỗi alkenyl có ít nhất một liên kết đôi trong chuỗi và chuỗi alkynyl có ít nhất một liên kết ba trong chuỗi. Các ví dụ về các nhóm alkenyl bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, etylen hoặc vinyl, allyl, -1-butenyl, -2-butenyl, -isobutylenyl, -1-pentenyl, -2-pentenyl, -3-metyl-1-butenyl, -2-metyl-2-butenyl, và -2,3-dimetyl-2-butenyl. Các ví dụ về các nhóm alkynyl bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, axetylen, propargyl, axetylenyl, propynyl, -1-butynyl, -2-butynyl, -1-pentynyl, -2-pentynyl, và -3-metyl-1 butynyl.

Đối với các nhóm alkyl, các nhóm alkenyl và alkynyl có thể được thế. Nhóm alkenyl hoặc alkynyl “được thế” là nhóm được thế bằng một hoặc nhiều nhóm, tốt hơn là từ 1 đến 3 nhóm (và các phần tử thế bổ sung bất kỳ được chọn từ halogen), bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -halogen, $-O-(C_1-C_8 \text{ alkyl})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ alkenyl})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ alkynyl})$, $-aryl$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $=O$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ và $-CN$, trong đó mỗi R' độc lập được chọn từ $-H$, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_2-C_8$ alkenyl, $-C_2-C_8$ alkynyl, hoặc $-aryl$ và trong đó các nhóm $-O-(C_1-C_8 \text{ alkyl})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ alkenyl})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ alkynyl})$, $-aryl$, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_2-C_8$ alkenyl, và $-C_2-C_8$ alkynyl này có thể có thể tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_2-C_8$ alkenyl, $-C_2-C_8$ alkynyl, -halogen, $-O-(C_1-C_8 \text{ alkyl})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ alkenyl})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ alkynyl})$, $-aryl$, $-C(O)R''$, $-OC(O)R''$, $-C(O)OR''$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR''$, $-C(O)N(R'')_2$, $-NHC(O)R''$, $-SR''$, $-SO_3R''$, $-S(O)_2R''$, $-S(O)R''$, $-OH$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R'')$, $-N(R'')_2$ và $-CN$, trong đó mỗi R'' độc lập được chọn từ $-H$, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_2-C_8$ alkenyl, $-C_2-C_8$ alkynyl, hoặc $-aryl$.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “alkylen” đề cập đến gốc hydrocarbon mạch thẳng hoặc phân nhánh có khoảng từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon (và tất cả các tổ kết hợp và sự tổ hợp nhỏ của các khoảng và số nguyên tử cacbon cụ thể ở đây), với khoảng từ 1 đến 8 nguyên tử cacbon là được ưu tiên và có hai trung tâm gốc hóa trị một có nguồn gốc từ việc loại bỏ hai nguyên tử hydro từ hai nguyên tử cacbon giống

nhau hoặc khác nhau của alkan ban đầu. Các alkylen điển hình bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, metylen, etylen, propylen, butylen, pentylen, hexylen, heptylen, octylen, nonylen, decalen, 1,4-xyclohexylen, và chất tương tự. Các nhóm alkylen, dù là riêng rẽ hoặc là một phần của nhóm khác, có thể tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm, ưu tiên là từ 1 đến 3 nhóm (và các phần tử thế bổ sung bất kỳ được chọn từ halogen), bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -halogen, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ và -CN, trong đó mỗi R' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc -aryl và trong đó các nhóm -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, và -C₂-C₈ alkynyl này có thể được tùy ý thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -halogen, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ và -CN, trong đó mỗi R'' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc -aryl.

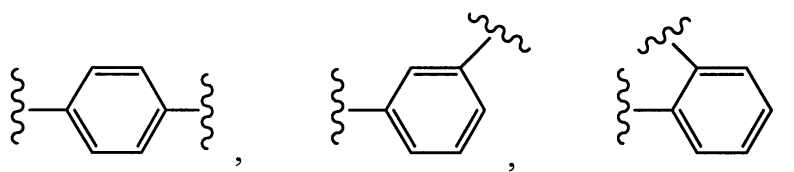
Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “alkenylen” đề cập đến nhóm alkylen được thế tùy ý chứa ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon. Các nhóm alkenylen điển hình bao gồm, ví dụ, etenylen (-CH=CH-) và propenylen (-CH=CHCH₂-).

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “alkynylen” đề cập đến nhóm alkylen được thế tùy ý chứa ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon. Các nhóm alkynylen điển hình bao gồm, ví dụ, axetylen (-C≡C-), propargyl (-CH₂C≡C-), và 4-pentylnyl (-CH₂CH₂CH₂C≡CH-).

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “aryl” đề cập đến gốc hydrocarbon thơm hóa trị một có từ 6-20 nguyên tử cacbon (và tất cả sự kết hợp và sự kết hợp phụ của các loại và các số nguyên tử cacbon cụ thể ở đây) có nguồn gốc từ sự loại bỏ một nguyên tử hydro từ một nguyên tử cacbon của hệ thống vòng thơm ban đầu. Một số nhóm aryl được mô tả trong các cấu trúc điển hình là “Ar”. Các nhóm aryl điển hình bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các gốc có nguồn gốc từ benzen, benzen được thế, phenyl, naphtalen, anthracen, biphenyl, và gốc tương tự.

Nhóm aryl, dù là riêng rẽ hoặc là một phần của nhóm khác, có thể tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều, tốt hơn là từ 1 đến 5, hoặc thậm chí từ 1 đến 2 nhóm bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -halogen, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ và -CN, trong đó mỗi R' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc -aryl và trong đó các nhóm -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), và -aryl này có thể tùy ý được thể tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -halogen, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ và -CN, trong đó mỗi R'' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc -aryl.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “arylen” đề cập đến nhóm aryl được thể tùy ý có hóa trị hai (*nghĩa là*, có nguồn gốc từ sự loại bỏ hai nguyên tử hydro từ hai nguyên tử cacbon giống nhau hoặc khác nhau của hệ thống vòng thơm ban đầu) và có thể là ở các cấu hình ortho, meta, hoặc para như được thể hiện trong các cấu trúc sau với phenyl là nhóm aryl điển hình:



Các nhóm “-(C₁-C₈ alkylen)aryl,” “-(C₂-C₈ alkenylen)aryl”, “và -(C₂-C₈ alkynylen)aryl” điển hình bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, benzyl, 2-phenyletan-1-yl, 2-phenylen-1-yl, naphthylmetyl, 2-naphthylethan-1-yl, 2-naphthylethen-1-yl, naphthobenzyl, 2-naphthophenylethan-1-yl và nhóm tương tự.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “dị vòng” đề cập đến hệ một vòng, hai vòng, hoặc đa vòng có từ 3 đến 14 nguyên tử vòng (cũng được đề cập đến là các thành phần của vòng) trong đó ít nhất một nguyên tử vòng trong ít nhất một vòng là nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, hoặc S (và tất cả các tổ hợp và tổ hợp nhỏ của các

khoảng và số nguyên tử cacbon cụ thể và nguyên tử khác loại ở đây). Dị vòng có thể có từ 1 đến 4 nguyên tử vòng khác loại độc lập được chọn từ N, O, P, hoặc S. Một hoặc nhiều nguyên tử N, C, hoặc S trong dị vòng có thể được oxy hóa. Dị vòng dạng đơn vòng được ưu tiên là có từ 3 đến 7 cạnh (ví dụ, từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon và từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ N, O, P, hoặc S), và dị vòng dạng vòng kép được ưu tiên là có từ 5 đến 10 cạnh (ví dụ, từ 4 đến 9 nguyên tử cacbon và từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ N, O, P, hoặc S). Vòng này bao gồm nguyên tử khác loại có thể là thơm hoặc không thơm. Trừ khi có quy định khác, dị vòng được gắn với nhóm gắn treo của nó ở nguyên tử khác loại bất kỳ hoặc nguyên tử cacbon mà thu được ở cấu trúc ổn định.

Các dị vòng được mô tả trong Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), cụ thể là các chương 1, 3, 4, 6, 7, và 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), cụ thể là các tập 13, 14, 16, 19, và 28; và *J. Am. Chem. Soc.* 82:5566 (1960).

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "heteroxyclo" đề cập đến nhóm dị vòng được thể tùy ý như được xác định trên đây có hóa trị (nghĩa là, có nguồn gốc từ sự loại bỏ hai nguyên tử hydro từ nguyên tử cacbon giống nhau hoặc khác nhau của hệ thống vòng dị vòng ban đầu).

Các ví dụ về các nhóm "dị vòng" bao gồm bằng cách ví dụ và không giới hạn đến pyridyl, dihydropyridyl, tetrahydropyridyl (piperidyl), thiazolyl, pyrimidinyl, furanyl, thienyl, pyrolyl, pyrazolyl, imidazolyl, tetrazolyl, benzofuranyl, thianaphthalenyl, indolyl, indolenyl, quinolinyl, isoquinolinyl, benzimidazolyl, piperidinyl, 4-piperidonyl, pyrrolidinyl, 2-pyrrolidonyl, pyrolinyl, tetrahydrofuranyl, bis-tetrahydrofuranyl, tetrahydropyranyl, bis-tetrahydropyranyl, tetrahydroquinolinyl, tetrahydroisoquinolinyl, decahydroquinolinyl, octahydroisoquinolinyl, azoxinyl, triazinyl, 6H-1,2,5-thiadiazinyl, 2H,6H-1,5,2-dithiazinyl, thienyl, thianthrenyl, pyranyl, isobenzofuranyl, chromenyl, xanthenyl, phenoxathinyl, 2H-pyrolyl, isothiazolyl, isoxazolyl, pyrazinyl, pyridazinyl, indolizinyl, isoindolyl, 3H-indolyl, 1H-indazolyl, purinyl, 4H-quinolizinyl, phthalazinyl, naphthyridinyl, quinoxalinyl, quinazolinyl, cinolinyl, pteridinyl, 4H-carbazolyl, carbazolyl, β -carbolinyl, phenanthridinyl, acridinyl, pyrimidinyl, phenanthrolinyl, phenazinyl, phenothiazinyl,

furazanyl, phenoxazanyl, isochromanyl, chromanyl, imidazolidinyl, imidazoliny, pyrazolidinyl, pyrazoliny, piperaziny, indoliny, isoindoliny, quinuclidiny, morpholiny, oxazolidinyl, benzotriazolyl, benzisoxazolyl, oxindolyl, benzoxazoliny, và isatinoyl. Các nhóm “dị vòng” được ưu tiên, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, benzofuranyl, benzothiophenyl, indolyl, benzopyrazolyl, coumariny, isoquinoliny, pyrolyl, thiophenyl, furanyl, thiazolyl, imidazolyl, pyrazolyl, triazolyl, quinoliny, pyrimidinyl, pyridiny, pyridonyl, pyraziny, pyridaziny, isothiazolyl, isoxazolyl và tetrazolyl.

Nhóm dị vòng, dù là riêng rẽ hoặc là một phần của nhóm khác, có thể tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều nhóm, ưu tiên là từ 1 đến 2 nhóm, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -halogen, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ và -CN, trong đó mỗi R' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc -aryl và trong đó các nhóm -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, và -aryl này có thể tùy ý được thể tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -halogen, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ và -CN, trong đó mỗi R'' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc aryl.

Bằng cách ví dụ và không giới hạn đến, các dị vòng có liên kết cacbon có thể được liên kết ở các vị trí sau: vị trí 2, 3, 4, 5, hoặc 6 của pyridin; vị trí 3, 4, 5, hoặc 6 của pyridazin; vị trí 2, 4, 5, hoặc 6 của pyrimidin; vị trí 2, 3, 5, hoặc 6 của pyrazin; vị trí 2, 3, 4, hoặc 5 của furan, tetrahydrofuran, thiofuran, thiophen, pyrol hoặc tetrahydropyrol; vị trí 2, 4, hoặc 5 của oxazol, imidazol hoặc thiazol; vị trí 3, 4, hoặc 5 của isoxazol, pyrazol, hoặc isothiazol; vị trí 2 hoặc 3 của aziridin; vị trí 2, 3, hoặc 4 của azetidin; vị trí 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 của quinolin; hoặc vị trí 1, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 của isoquinolin. Điển hình hơn nữa, các dị vòng có liên kết cacbon bao gồm 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, 5-pyridyl, 6-pyridyl, 3-pyridaziny, 4-pyridaziny, 5-pyridaziny,

6-pyridazinyl, 2-pyrimidinyl, 4-pyrimidinyl, 5-pyrimidinyl, 6-pyrimidinyl, 2-pyrazinyl, 3-pyrazinyl, 5-pyrazinyl, 6-pyrazinyl, 2-thiazolyl, 4-thiazolyl, hoặc 5-thiazolyl.

Bằng cách ví dụ và không giới hạn đến, các dị vòng có liên kết ni tơ có thể được liên kết ở vị trí 1 của aziridin, azetidin, pyrol, pyrrolidin, 2-pyrolin, 3-pyrolin, imidazol, imidazolidin, 2-imidazolin, 3-imidazolin, pyrazol, pyrazolin, 2-pyrazolin, 3-pyrazolin, piperidin, piperazin, indol, indolin, hoặc 1H-indazol; vị trí 2 của isoindol, hoặc isoindolin; vị trí 4 của morpholin; và vị trí 9 của carbazol, hoặc β -carbolin. Điển hình hơn nữa, các dị vòng có liên kết ni tơ bao gồm 1-aziridyl, 1-azetetyl, 1-pyrollyl, 1-imidazolyl, 1-pyrazolyl, và 1-piperidinyl.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “vòng cacbon,” đề cập đến hệ vòng đơn vòng, hai vòng, hoặc đa vòng không thơm bão hòa hoặc không bão hòa có từ 3 đến 14 nguyên tử vòng (và tất cả các tổ hợp và tổ hợp nhỏ của các khoảng và các số nguyên tử cacbon cụ thể ở đây) trong đó tất cả các nguyên tử vòng là nguyên tử cacbon. Các vòng cacbon đơn vòng được ưu tiên là có từ 3 đến 6 nguyên tử vòng, ưu tiên hơn là có 5 hoặc 6 nguyên tử vòng. Các vòng cacbon hai vòng được ưu tiên là có từ 7 đến 12 nguyên tử vòng, ví dụ, được sắp xếp là hệ hai vòng [4,5], [5,5], [5,6] hoặc [6,6], hoặc có 9 hoặc 10 nguyên tử vòng được sắp xếp là hệ hai vòng [5,6] hoặc [6,6]. Thuật ngữ “vòng cacbon” bao gồm, ví dụ, vòng cacbon đơn vòng được dung hợp với vòng aryl (ví dụ, vòng dạng vòng cacbon đơn vòng được dung hợp với vòng benzen). Các vòng cacbon được ưu tiên là có từ 3 đến 8 cacbon nguyên tử vòng.

Các nhóm vòng cacbon, dù là riêng rẽ hoặc là một phần của nhóm khác, có thể tùy ý được thế bằng, ví dụ, một hoặc nhiều nhóm, ưu tiên là 1 hoặc 2 nhóm (và phần tử thế bổ sung bất kỳ được chọn từ halogen), bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -halogen, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ và -CN, trong đó mỗi R' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc -aryl và trong đó các nhóm -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), và -aryl này có thể tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -

halogen, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -aryl, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ và -CN, trong đó mỗi R'' độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, hoặc -aryl.

Các ví dụ về phân tử thể vòng cacbon đơn vòng bao gồm -xyclopropyl, -xyclobutyl, -xyclopentyl, -1-xyclopent-1-enyl, -1-xyclopent-2-enyl, -1-xyclopent-3-enyl, xyclohexyl, -1-xyclohex-1-enyl, -1-xyclohex-2-enyl, -1-xyclohex-3-enyl, -xycloheptyl, -xyclooctyl, -1,3-xyclohexadienyl, -1,4-xyclohexadienyl, -1,3-xycloheptadienyl, -1,3,5-xycloheptatrienyl, và -xyclooctadienyl.

“Cacboxyclo,” dù được sử dụng riêng rẽ hoặc là một phần của nhóm khác, đề cập đến nhóm vòng cacbon được thể tùy ý như được xác định trên đây có hóa trị hai (nghĩa là, có nguồn gốc từ sự loại bỏ hai nguyên tử hydro của hai nguyên tử cacbon giống nhau hoặc khác nhau của hệ vòng cacbon ban đầu).

Trừ khi được chỉ định khác bởi ngữ cảnh, dấu nối (-) chỉ định điểm gắn với phân tử gắn treo. Do đó, thuật ngữ “-(C₁-C₈ alkyl)enyl” hoặc “-C₁-C₈ alkyl(enyl)” đề cập đến gốc C₁-C₈ alkylen như được xác định ở đây trong đó gốc alkylen được gắn với phân tử treo ở nguyên tử cacbon bất kỳ của gốc alkylen và một trong số các nguyên tử hydro được liên kết với nguyên tử cacbon của gốc alkylen được thay bằng gốc aryl như được xác định ở đây.

Khi nhóm cụ thể được “thể”, nhóm này có thể có một hoặc nhiều phân tử thể, ưu tiên là có từ một đến năm phân tử thể, ưu tiên hơn là từ một đến ba phân tử thể, ưu tiên nhất là từ một đến hai phân tử thể, độc lập được chọn từ danh sách các phân tử thể. Tuy nhiên, nhóm này có thể thường có số phân tử thể bất kỳ được chọn từ halogen. Các nhóm được thể cũng được chỉ định.

Được cho rằng định nghĩa phân tử thể bất kỳ hoặc biến số ở vị trí cụ thể trong phân tử là phụ thuộc vào định nghĩa của nó ở đâu đó trong phân tử này. Được hiểu rằng phân tử thể và các mô hình thể trên các hợp chất theo sáng chế này có thể được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực để tạo nên các hợp chất ổn định về mặt hóa học và có thể được tổng hợp dễ dàng bằng các kỹ thuật được biết trong lĩnh vực cũng như các phương pháp được nêu ở đây.

Các nhóm bảo vệ như được sử dụng ở đây đề cập đến nhóm phong bế chọn lọc, tạm thời hoặc lâu dài, một vị trí phản ứng trong hợp chất đa chức. Các nhóm bảo vệ hydroxyl thích hợp để sử dụng trong sáng chế là được dùng và có thể cần hoặc có thể không cần được phân giải khỏi hợp chất ban đầu sau khi dùng cho đối tượng để hợp chất này có hoạt tính. Sự phân giải thông qua các quá trình chuyển hóa bình thường trong cơ thể. Các nhóm bảo vệ hydroxy được biết nhiều trong lĩnh vực, xem, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS by T. W. *Greene* và P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3rd Edition) được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó và cho tất cả các mục đích và bao gồm, ví dụ, các nhóm bảo vệ ete (ví dụ, alkyl ete và silyl ete bao gồm, ví dụ, dialkylsilylete, trialkylsilylete, dialkylalkoxysilylete), este, cacbonat, carbamat, sulfonat, và phosphat. Các ví dụ về các nhóm bảo hydroxy bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, metyl ete; metoxymetyl ete, metylthiometyl ete, (phenyldimetylsilyl)metoxymetyl ete, benzyloxymetyl ete, p-metoxybenzyloxymetyl ete, p-nitrobenzyloxymetyl ete, o-nitrobenzyloxymetyl ete, (4-metoxyphenoxy)metyl ete, guaiacolmetyl ete, t-butoxymetyl ete, 4-pentenylloxymetyl ete, siloxymetyl ete, 2-metoxyetoxymetyl ete, 2,2,2-tricloetoxymetyl ete, bis(2-cloetoxymetyl ete, 2-(trimetylsilyl)etoxymetyl ete, menthoxymetyl ete, tetrahydropyranyl ete, 1-metoxycylcohexyl ete, 4-metoxytetrahydrothiopyranyl ete, 4-metoxytetrahydrothiopyranyl ete S,S-Dioxit, 1-[(2-choro-4-metyl)phenyl]-4-metoxypiperidin-4-yl ete, 1-(2-flophneyl)-4-metoxypiperidin-4-yl ete, 1,4-dioxan-2-yl ete, tetrahydrofuranyl ete, tetrahydrothiofuranyl ete; etyl ete được thể như 1-etoxyetyl ete, 1-(2-cloetoxymetyl ete, 1-[2-(trimetylsilyl)etoxymetyl ete, 1-metyl-1-metoxyetyl ete, 1-metyl-1-benzyloxyetyl ete, 1-metyl-1-benzyloxy-2-floetyl ete, 1-metyl-1phenoxyetyl ete, 2-trimetylsilyl ete, t-butyl ete, allyl ete, propargyl ete, p-clophenyl ete, p-metoxyphenyl ete, benzyl ete, p-metoxybenzyl ete 3,4-dimetoxymetyl ete, trimetylsilyl ete, trietylsilyl ete, tripropylsilylete, dimetylisopropylsilyl ete, dietylisopropylsilyl ete, dimetylhexylsilyl ete, t-butyldimetylsilyl ete, diphenylmetylsilyl ete, benzoylformat este, axetat este, cloaxetat este, dicloaxetat este, tricloaxetat este, trifloaxetat este, metoxyaxetat este, triphneylmetoxyaxetat este, phenylaxetat este, benzoat este, alkyl metyl cacbonat, alkyl 9-fluorenylmetyl cacbonat, alkyl etyl cacbonat, alkyl 2,2,2-tricloetyl cacbonat, 1,1,-dimetyl-2,2,2-tricloetyl cacbonat, alkylsulfonat, metansulfonat, benzylsulfonat, tosylat, metylen axetal,

etyliden axetal, và t-butylmetyliden ketal. Các nhóm bảo vệ được ưu tiên được mô tả bằng công thức -R, -Si(R)(R)(R), -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NH(R), -S(O)₂R, -S(O)₂OH, P(O)(OH)₂, và -P(O)(OH)OR, trong đó R là C₁-C₂₀ alkyl, C₂-C₂₀ alkenyl, C₂-C₂₀ alkynyl, -C₁-C₂₀ alkylen(vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkenylen(vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkynylene(vòng cacbon), -C₆-C₁₀ aryl, -C₁-C₂₀ alkylen(aryl), -C₂-C₂₀ alkenylen(aryl), -C₂-C₂₀ alkynylen(aryl), -C₁-C₂₀ alkylen(dị vòng), -C₂-C₂₀ alkenylen(dị vòng), hoặc -C₂-C₂₀ alkynylen(dị vòng) trong đó các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkylen, alkenylen, alkynylen, aryl, vòng cacbon, và dị vòng này dù là riêng rẽ hoặc là một phần của nhóm khác tùy ý được thế.

Chữ viết tắt “AFP” đề cập đến dimethylvalin-valin-dolaisoleuxin- dolaproin-phenylalanin-p-phenylenediamin (xem công thức (XVIII) *infra*).

Chữ viết tắt “MMAE” đề cập đến monometyl auristatin E (xem công thức (XIII) *infra*).

Chữ viết tắt “AEB” đề cập đến este được tạo ra bằng phản ứng của auristatin E với axit paraaxetyl benzoic (xem công thức (XXII) *infra*).

Chữ viết tắt “AEVB” đề cập đến este được tạo ra bằng phản ứng của auristatin E với axit benzoylvaleric (xem công thức (XXIII) *infra*).

Chữ viết tắt “MMAF” đề cập đến monometyl auristatin F (xem công thức (XXI) *infra*).

Các kháng thể

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề cập đến các phân tử kháng thể kháng GCC có các đặc điểm như các đặc điểm được tóm tắt trong Bảng 1 và 2. Trong các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các phân tử kháng thể kháng GCC có các đặc điểm như các đặc điểm được tóm tắt trong các bảng 3, 4, 5 và/hoặc 6.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC là kháng thể tế bào lai của người và là một trong số các kháng thể 5F9, 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3 và 1D3. Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC có nguồn gốc từ kháng thể 5F9, 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3, hoặc 1D3. Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC được sản xuất bằng tế bào lai 5F9 (PTA-8132).

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC là kháng thể lympho bào chọn lọc và là một trong số các kháng thể Abx-12, Abx-020, Abx-106, Abx-198, Abx-221, Abx-229, Abx-338, và Abx-393. Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC có nguồn gốc từ kháng thể Abx-12, Abx-020, Abx-106, Abx-198, Abx-221, Abx-229, Abx-338, và Abx-393.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC là kháng thể chuột và là một trong số các kháng thể mAb 3G1, mAb 8E12, mAb10B8, và mAb 8F1. Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC có nguồn gốc từ kháng thể mAb 3G1, mAb 8E12, và mAb 8F1.

Theo một phương án, các phân tử kháng thể kháng GCC sẽ có ái lực với GCC, ví dụ, khi được đo bằng liên kết trực tiếp hoặc các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh, trong giới hạn được mô tả ở đây. Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC có K_d nhỏ hơn $1 \times 10^{-6} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-7} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-8} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-9} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-10} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-11} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-12} M$, hoặc nhỏ hơn $1 \times 10^{-13} M$. Theo một phương án, phân tử kháng thể là IgG, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và có K_d nhỏ hơn $1 \times 10^{-6} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-7} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-8} M$, hoặc nhỏ hơn $1 \times 10^{-9} M$. Theo một phương án, các phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng thể 5F9 hoặc kháng thể có nguồn gốc từ đó có K_d là khoảng từ 80 đến khoảng 200 pM, ưu tiên là khoảng từ 100 đến khoảng 150 pM hoặc khoảng 120 pM. Theo một phương án, các phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng thể 5F9 hoặc kháng thể có nguồn gốc từ đó có k_a là khoảng từ 0,9 đến khoảng $1,25 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, ưu tiên là khoảng $1,1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$. Theo một phương án, phân tử kháng thể là ScFv và có K_d nhỏ hơn $1 \times 10^{-6} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-7} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-8} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-9} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-10} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-11} M$, nhỏ hơn $1 \times 10^{-12} M$, hoặc nhỏ hơn $1 \times 10^{-13} M$.

Theo các phương án, các phân tử kháng thể không phải là các thể liên hợp miễn dịch, nghĩa là, “trần” và trong các phương án, gây ra đáp ứng tế bào khi gắn kết với GCC. Trong các phương án liên quan, đáp ứng tế bào được thực hiện bằng tế bào biểu hiện GCC mà kháng thể gắn kết với. Đáp ứng tế bào này có thể là sự truyền tín hiệu gây ra bởi GCC, ví dụ, nếu phân tử kháng thể là chất chủ vận của GCC (xem, ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số US20040258687). Theo các phương án khác, đáp ứng tế bào này được thực hiện nhờ tế bào thứ hai, ví dụ, tế bào gây hiệu ứng miễn dịch (ví dụ, tế bào giết tự nhiên) nhận biết phân tử kháng thể gắn kết với GCC trên tế

bào thứ nhất. Theo một số phương án, các phân tử giám sát, ví dụ, các phân tử bổ thể, tiếp xúc với phân tử kháng thể liên kết GCC trước đáp ứng tế bào. Các đáp ứng tế bào trong các phương án này có thể gây ra chết tế bào biểu hiện GCC.

Theo các phương án nữa, các phân tử kháng thể mà là các thể liên hợp miễn dịch có thể cả hai gây ra đáp ứng tế bào khi liên kết với GCC và nội nhập để phân phối chất đến tế bào biểu hiện GCC mà nó liên kết với.

Theo một số phương án, các phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể chẹn liên kết phối tử với GCC.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC không thể hiện phản ứng chéo đáng kể với một hoặc cả hai GCC chuột cống và GCC chuột.

Theo một phương án, phân tử kháng thể này không phải là GCC:B10, GCC:4D7 hoặc GCC:C8. Theo phương án khác, các phân tử kháng thể kháng GCC không liên kết với miền nội bào của GCC, khoảng gốc axit amin từ 455 đến 1073 của SEQ ID NO:228. Ví dụ, trong phương án này, các phân tử kháng thể kháng GCC không liên kết với miền tương đồng kinaza hoặc miền guanylyl xyclaza của GCC.

Đơn vị cấu trúc kháng thể của động vật có vú có trong tự nhiên điển hình là tetrame. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25 kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng từ 50-70 kDa). Phần đầu tận cùng amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi có khoảng từ 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin hơn đáp ứng sơ bộ sự nhận biết kháng nguyên. Phần đầu tận cùng carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định đáp ứng sơ bộ cho chức năng hiệu ứng. Các chuỗi nhẹ của người có thể được phân loại là chuỗi nhẹ kappa và lambda. Các chuỗi nặng có thể được phân loại là mu, delta, gama, alpha, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể tương ứng là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Trong các chuỗi nhẹ và nặng, các vùng biến đổi và ổn định được nối bằng vùng “J” có khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng cũng bao gồm vùng “D” có khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. Xem chung, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Các vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/nặng tạo thành vị trí gắn kết kháng thể. Các isotyp được ưu tiên cho các phân tử kháng thể kháng GCC là các globulin miễn dịch IgG, mà có thể được phân loại thành bốn nhóm phụ, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, có các chuỗi nặng gama khác nhau. Hầu hết các kháng thể để điều trị

bệnh là kháng thể người, khảm, hoặc được làm giống như của người có typ IgG1. Theo phương án cụ thể, phân tử kháng thể kháng-GCC có isotyp IgG1.

Các vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nặng và nhẹ tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên. Do đó, kháng thể IgG nguyên vẹn có hai vị trí gắn kết kháng nguyên giống nhau. Tuy nhiên, các kháng thể đặc hiệu kép hoặc chức năng kép là các cấu trúc lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau, dẫn đến hai vị trí gắn kết khác nhau.

Tất cả các chuỗi thể hiện cấu trúc chung các vùng khung (framework region-FR) khá bảo toàn giống nhau được nối bằng ba vùng siêu biến, cũng được gọi là các vùng xác định bổ trợ hoặc (CDR - complementarity determining region). Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp được sắp hàng nhờ các vùng khung, cho phép gắn kết với epitop đặc hiệu. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, cả hai chuỗi nhẹ và nặng chứa các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Sự chỉ định axit amin cho mỗi miền là theo các định nghĩa của các trình tự Kabat của các protein quan tâm miễn dịch (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991)), hoặc Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). Như được sử dụng ở đây, các CDR được đề cập đến cho mỗi chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2, HCDR3) và chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Các phân tử kháng thể kháng GCC có thể chứa tất cả, hoặc nhóm nhỏ gồm các CDR gắn kết kháng nguyên, của một hoặc cả hai, chuỗi nặng và nhẹ, của một trong số tế bào lai của người, lympho bào chọn lọc, hoặc kháng thể chuột được đề cập trên đây. Trình tự axit amin của tế bào lai của người, lympho bào chọn lọc và các phân kháng thể của chuột, bao gồm các vùng biến đổi và các CDR, có thể được tìm thấy trong bảng 3 và bảng 5.

Do đó, theo một phương án, phân tử kháng thể bao gồm một hoặc cả hai:

(a) một, hai, ba, hoặc một số sự gắn kết kháng nguyên của các CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và/hoặc LCDR3) của một trong số tế bào lai của người, lympho bào chọn lọc, hoặc kháng thể chuột được đề cập trên đây. Theo các phương án, (các) CDR có thể chứa trình tự axit amin của một hoặc nhiều hoặc tất cả LCDR1-3 như sau: LCDR1, hoặc LCDR1 được cải biến, trong đó từ một đến bảy axit amin được thay thế bảo toàn) LCDR2, hoặc LCDR2 được cải biến trong đó một hoặc hai axit amin được

thay thế bảo toàn); hoặc LCDR3, hoặc LCDR3 cải biến trong đó một hoặc hai axit amin được thay thế bảo toàn; và

(b) một, hai, ba, hoặc một số sự gắn kết kháng nguyên của các CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và/hoặc HCDR3) của một trong số tế bào lai của người, lympho bào chọn lọc, hoặc kháng thể chuột được đề cập trên đây. Theo các phương án, (các) CDR này có thể chứa trình tự axit amin của một hoặc nhiều hoặc tất cả HCDR1-3 như sau: HCDR1, hoặc HCDR1 được cải biến, trong đó một hoặc hai axit amin được thay thế bảo toàn; HCDR2, hoặc HCDR2 được cải biến, trong đó từ một đến bốn axit amin được thay thế bảo toàn; hoặc HCDR3, hoặc HCDR3 được cải biến, trong đó một hoặc hai axit amin được thay thế bảo toàn.

Các yếu tố sinh miễn dịch hữu ích để sản xuất kháng thể kháng GCC bao gồm GCC ví dụ, các tế bào biểu hiện GCC của người (ví dụ, dòng tế bào khối u, ví dụ, các tế bào T84, hoặc các tế bào khối u ruột kết đông lạnh hoặc mới, các tế bào tái tổ hợp biểu hiện GCC); các phân đoạn màng của các tế bào biểu hiện GCC (ví dụ, dòng tế bào khối u ruột kết, ví dụ, các tế bào T84, hoặc các tế bào khối u ruột kết đông lạnh hoặc mới, các tế bào tái tổ hợp biểu hiện GCC, ví dụ, các tế bào HT-29-GCC#2, biểu hiện GCC có chiều dài đầy đủ, hoặc phần của nó, ví dụ, các tế bào CHO GCC #27 biểu hiện phần chứa miền ngoại bào GCC, ví dụ, SEQ ID NO:318); GCC tinh khiết hoặc phân tách, ví dụ, protein GCC của người (ví dụ, GCC được phân tách về mặt sinh hóa, ví dụ, được phân tách từ các tế bào khối u dạ dày đường ruột hoặc các tế bào tái tổ hợp biểu hiện GCC hoặc biến thể của nó), hoặc phần của nó (ví dụ, miền ngoại bào của GCC, miền tương đồng kinaza của GCC hoặc miền xúc tác guanylyl xyclaza của GCC hoặc peptit tương ứng với phần của nó, ví dụ, chứa ít nhất khoảng 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 hoặc 32 gốc axit amin của SEQ ID NO:228); hoặc yếu tố sinh miễn dịch chứa SEQ ID NO:229 hoặc chứa phần đầy đủ của nó mà không có trình tự tín hiệu (nghĩa là, không có các gốc axit amin từ 1 đến khoảng 21 hoặc 23 của SEQ ID NO:229), ví dụ, protein TOK107-hIgG trưởng thành, SEQ ID NO:317.

Các yếu tố sinh miễn dịch có thể được dung hợp với các trình tự khác loại để trợ giúp thao tác sinh hóa, tinh chế, gây miễn dịch hoặc đo chuẩn độ kháng thể. Các yếu tố sinh miễn dịch này có thể chứa một phần GCC, ví dụ, miền ngoại bào, và phần chứa polypeptit không phải GCC. Nhiều quan điểm tồn tại để xây dựng protein dung hợp để dễ dàng tinh chế hoặc bất động lên trên giá đỡ rắn, ví dụ, cột ái lực hoặc đĩa vi

chuẩn hoặc cơ chất/chip thử nghiệm thích hợp khác. Ví dụ, gốc dung hợp có thể bổ sung miền, *ví dụ*, glutathion-S-transferaza/kinaza (glutathione-S-transferase-GST), mà có thể liên kết glutathion; vùng Fc của globulin miễn dịch, mà có thể liên kết với protein A hoặc protein G; các gốc axit amin, *ví dụ*, hai, ba, bốn, năm, ưu tiên là sáu gốc histidin mà có thể liên kết với niken hoặc coban trên cột ái lực; đuôi epitop, *ví dụ*, phần gen gây ung thư c-myc (myc-tag), đuôi FLAG (Patent Mỹ số 4,703,004), đuôi hemagglutinin (HA), đuôi T7 gen 10, đuôi V5, đuôi HSV, hoặc đuôi VSV-G mà có thể liên kết kháng thể đặc hiệu đuôi; hoặc đồng yếu tố, *ví dụ*, biotin, mà có thể liên kết với streptavidin.

Các yếu tố sinh miễn dịch chứa vùng Fc của globulin miễn dịch có thể giữ GCC, trong dung dịch hoặc được gắn với tế bào, trong cấu hình cho phép tiếp cận cấu trúc với các epitop GCC nhờ các thành phần giám sát miễn dịch vật chủ để tạo nên kháng thể hiệu quả. Vì các chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa các vùng Fc liên kết thành các dime thông qua các liên kết disulfua giữa các chuỗi, các yếu tố sinh miễn dịch thu được từ sự dung hợp với các vùng Fc là các dime. Hóa trị của các protein dung hợp có thể phản ánh kiểu globulin miễn dịch đóng góp vùng Fc. Ví dụ, sự dung hợp với các protein IgG có thể là các dime, sự dung hợp IgA có thể tạo nên các yếu tố sinh miễn dịch tetrame, và sự dung hợp IgM có thể tạo nên các yếu tố sinh miễn dịch decame, sự dung hợp IgA và sự dung hợp IgM được dễ dàng đồng chuyển nhiễm chuỗi J. Globulin miễn dịch điển hình cho protein dung hợp Fc là IgG1. Phần được sử dụng thường có vùng bản lề IgG1, các miền CH2 và CH3 được mã hóa bởi exon riêng rẽ. Bởi vì exon này cũng có một phần của vùng CH1, mà có xystein được hướng đến liên kết disulfua với xystein của chuỗi nhẹ, sự cải biến hữu ích là để gây đột biến xystein CH1, *ví dụ*, thành serin, để đảm bảo không có xystein được bắt cặp trong protein dung hợp. Sự đột biến này cũng làm gia tăng sự linh động của vùng bản lề này.

Phần Fc có nguồn gốc từ loài không phải vật chủ, *ví dụ*, vùng Fc Ig của người, để dung hợp với yếu tố sinh miễn dịch để gây miễn dịch trong vật chủ, *ví dụ*, chuột, chuột cống, thỏ, dê, có tác dụng làm tá dược. Chức năng của tá dược này có thể kích thích các kháng thể đặc hiệu kháng lại cả hai Fc và các epitop GCC. Các kháng thể phản ứng Fc có thể được xác định và loại bỏ trong khi sàng lọc. Phần Fc có thể có trình tự kiểu đại hoặc trình tự được gây đột biến để thay đổi chức năng hiệu ứng. Ví dụ, vùng hằng định đột biến (biến thể) có thể được đưa vào trong protein dung hợp để

giảm thiểu sự gắn kết với các thụ thể Fc và/hoặc khả năng cố định bổ thể. (xem ví dụ Winter et al., GB 2,209,757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351). Trong ví dụ được ưu tiên, lysin 235 và glyxin 237, được đánh số theo các tiêu chuẩn vùng Fc, bị gây đột biến, ví dụ, thành alanin. Yếu tố sinh miễn dịch/protein dung hợp có IgG đột biến Fc có thể đã giảm tương tác với các thụ thể Fc trong vật chủ. Protein dung hợp yếu tố sinh miễn dịch hòa tan được ưu tiên (sau khi trưởng thành để phân giải peptit tín hiệu và tiết) là TOK-107-hIgG (tên khác hGCC-ECD/hIgG1 Fc), chứa các gốc axit amin từ 24 đến 430 của SEQ ID NO:228 được dung hợp với Fc globulin miễn dịch IgG1 của người bị đột biến (SEQ ID NO:317).

Để tạo ra yếu tố sinh miễn dịch được biểu hiện bởi tế bào, phần globulin miễn dịch có thể được tạo cấu trúc để bắt chước phần globulin miễn dịch của thụ thể tế bào B. Ví dụ, vùng Fc globulin miễn dịch có thể được dung hợp tiếp với polypeptit chứa vùng xuyên màng của thụ thể miễn dịch, như các thụ thể Fc γ , các thụ thể Fc α , thụ thể Fc α/μ hoặc các thụ thể Fc ϵ . Sự định hướng thích hợp yếu tố sinh miễn dịch liên kết với tế bào thụ thể Fc này có sự tiếp xúc thích hợp trên bề mặt tế bào có thể được cải thiện nếu tế bào này biểu hiện protein dung hợp yếu tố sinh miễn dịch chứa thêm các thành phần bổ sung của phức hệ thụ thể kháng nguyên, ví dụ, thụ thể IgM hoặc thụ thể IgD tế bào B. Các thành phần thích hợp của phức hệ này bao gồm các protein vỏ của globulin miễn dịch (Ig), như MB-1 và B29 (CD79A và CD79B; Hombach et al. *Eur. J. Immunol.* 20:2795-2799 (1990) đối với thụ thể IgM), mà tạo thành dị dimer. Các protein vỏ Ig có thể được tạo ra nội sinh bởi các tế bào chuyển nhiễm, ví dụ, nếu chuyển nhiễm dòng tế bào u lympho tế bào B; hoặc bằng cách đồng chuyển nhiễm yếu tố sinh miễn dịch với các protein vỏ, ví dụ, trong vector tách biệt hoặc trong cùng vector. Các protein vỏ IgG được ưu tiên để gây miễn dịch trong chuột là CD79a và CD79b của chuột (Số truy cập tương ứng trên Ngân hàng gen. NM_007655 và NM_008339). Protein dung hợp yếu tố sinh miễn dịch liên kết tế bào được ưu tiên (sau khi trưởng thành để phân giải peptit tín hiệu và di chuyển đến bề mặt tế bào) là sản phẩm TOK111, gồm TOK-107hIgG (hGCC-ECD/hIgG1 Fc) được dung hợp với IgG2a của chuột (ví dụ, số truy cập trên GenPept No. AAB59661) các miền xuyên màng và nội bào (SEQ ID NO:318).

Các epitop hữu ích, ví dụ, các epitop tham chiếu, của phân tử GCC, mà các phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, các kháng thể đơn dòng, các kháng thể của

người hoặc các kháng thể được làm giống như của người, như được mô tả ở đây, có thể được gắn kết với, có thể được tìm thấy trên phần ngoại bào của GCC. Các epitop GCC này có thể gắn kết với các phân tử kháng thể trên bề mặt của các tế bào, ví dụ, trên mặt ngoài của tế bào.

Ví dụ, epitop đối với phân tử kháng thể kháng GCC có thể tập trung trong, hoặc bao gồm (các) gốc từ các gốc 1-50 của SEQ ID NO:228, hoặc mảnh của nó mà gắn kết với các phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, mảnh gắn kết 5F9 của nó. Các mảnh này có thể chứa các gốc 1-25, 5-30, 10-35, 15-40, 20-45, 25-50, 5-45, 10-40, 15-35, 20-30 hoặc 33-50 của SEQ ID NO:228. Theo một số phương án, epitop đối với phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng thể 5F9, là epitop cấu hình chứa thêm một hoặc nhiều gốc axit amin bổ sung trong trình tự axit amin GCC bên ngoài gốc 50, nghĩa là, được chọn từ khoảng gốc 50 đến 1073 của SEQ ID NO:228.

Trong ví dụ khác, epitop đối với phân tử kháng thể kháng GCC có thể tập trung trong, hoặc bao gồm (các) gốc của SEQ ID NO:225, hoặc các gốc từ 271-300 của SEQ ID NO:228, hoặc mảnh của nó mà gắn kết với các phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, mảnh gắn kết ABX-198-, 3G1-, 8F1-, hoặc 10B8- của nó. Các mảnh này có thể chứa các gốc từ 281-290 của SEQ ID NO:228, hoặc các gốc từ 281-290 của SEQ ID NO:228 trong đó gốc 281 là leuxin, hoặc các gốc từ 281-300 hoặc các gốc từ 271-290 của SEQ ID NO:228. Theo một số phương án, epitop đối với các phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng thể ABX-198-, 3G1-, 8F1-, hoặc 10B8, là epitop cấu hình chứa thêm một hoặc nhiều gốc axit amin bổ sung, nghĩa là, các gốc không phải của SEQ ID NO:225 trong trình tự axit amin GCC ví dụ, được chọn từ khoảng gốc 1 đến 270 và/hoặc khoảng từ 301 đến 1073 của SEQ ID NO:228.

Trong ví dụ khác, epitop đối với phân tử kháng thể kháng GCC có thể tập trung trong, hoặc bao gồm (các) gốc của SEQ ID NO:226, hoặc các gốc từ 351-375 của SEQ ID NO:228, hoặc mảnh của nó mà gắn kết với các phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, mảnh gắn kết ABX-012-, ABX-338-, hoặc ABX-106- của nó. Các mảnh này có thể chứa các gốc từ 356-370 của SEQ ID NO:228, hoặc các gốc từ 351-370 của SEQ ID NO:228, hoặc các gốc từ 356-375 của SEQ ID NO:228. Theo một số phương án, epitop đối với các phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng thể ABX-012, ABX-338-, hoặc ABX-106, là epitop cấu hình chứa thêm một hoặc nhiều gốc axit amin bổ sung, nghĩa là, các gốc không phải của SEQ ID NO:226 trong trình tự axit

amin GCC ví dụ, được chọn từ khoảng gốc 1 đến 350 và/hoặc khoảng từ 376 đến 1073 của SEQ ID NO:228.

Các kháng thể gây ra sự kháng lại các epitop này hoặc miền ngoại bào, ví dụ, các epitop tập trung trong, hoặc bao gồm (các) từ gốc axit amin từ 24 đến 420 của SEQ ID NO:228, hoặc phần tham chiếu của nó, ví dụ, các gốc từ 24 đến 75, từ 75 đến 150, từ 150 đến 225, từ 225 đến 300, từ 300 đến 375 hoặc từ 375 đến 420 của GCC, hoặc các phân tử kháng thể có nguồn gốc từ đó, có thể là hữu ích làm các kháng thể điều trị bệnh hoặc chẩn đoán, như được mô tả ở đây.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC có một hoặc nhiều đặc điểm sau:

a) nó cạnh tranh liên kết, ví dụ, liên kết với GCC trên bề mặt tế bào hoặc GCC tinh chế, với một trong số các phân tử kháng thể kháng GCC được đề cập trên đây được tóm tắt trong bảng 1 và 2 ví dụ, các kháng thể tế bào lai của người (ví dụ, 5F9), các kháng thể lympho bào chọn lọc (ví dụ, Abx-229), hoặc các kháng thể của chuột (ví dụ, 3G1);

b) nó liên kết với epitop giống nhau hoặc hầu như giống nhau trên GCC ở dạng một trong số các phân tử kháng thể kháng GCC được đề cập trên đây được tóm tắt trong bảng 1 và 2, ví dụ, các kháng thể tế bào lai của người (ví dụ, 5F9), các kháng thể lympho bào chọn lọc (ví dụ, Abx-229), hoặc các kháng thể của chuột (ví dụ, 3G1). Theo một phương án, kháng thể này liên kết với epitop giống nhau, như được xác định bằng một hoặc nhiều thử nghiệm dây peptit hoặc bằng liên kết với các thể đột biến cắt cụt, các thể khảm hoặc các thể đột biến điểm được biểu hiện trên bề mặt tế bào hoặc các chế phẩm màng, ví dụ, như các thử nghiệm này được mô tả ở đây;

c) nó liên kết với epitop có chung ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 hoặc 20 gốc axit amin liên tiếp với epitop của một trong số các phân tử kháng thể kháng GCC được đề cập trên đây được tóm tắt trong bảng 1 và 2, ví dụ, các kháng thể tế bào lai của người (ví dụ, 5F9), các kháng thể lympho bào chọn lọc (ví dụ, Abx-229) hoặc các kháng thể của chuột (ví dụ, 3G1);

d) nó liên kết với vùng GCC của người mà được liên kết bởi kháng thể kháng GCC theo sáng chế, trong đó vùng này, ví dụ vùng ngoại bào hoặc bào chất, có chiều dài từ 10-15, 10-20, 20-30, hoặc 20-40 gốc, và liên kết được xác định, ví dụ, bằng cách

liên kết với các thể đột biến cắt cụt; Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC liên kết với vùng ngoại bào của GCC của người. Theo một phương án, các phân tử kháng thể kháng GCC có thể liên kết với phần GCC của miền ngoại bào của người được xác định bởi các gốc axit amin từ 24 đến 420 của SEQ ID NO:228. Theo một phương án, các phân tử kháng thể kháng GCC có thể liên kết với vị trí quan trọng guanylat xyclaza ở các gốc axit amin từ 931 đến 954 của SEQ ID NO:228; hoặc

e) nó liên kết với epitop tham chiếu được mô tả ở đây.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC liên kết với trình tự GCC ILVDFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTL (SEQ ID NO:225).

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng-GCC liên kết với trình tự GCC FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID NO:226).

Theo một phương án, phân tử kháng thể liên kết với epitop cấu hình. Theo các phương án khác, phân tử kháng thể liên kết với epitop tuyến tính.

Các phân tử kháng thể kháng GCC có thể là kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu đơn, kháng thể khảm (Xem Patent Mỹ số US 6.020.153) hoặc kháng thể của người hoặc được làm giống như của người hoặc các mảnh kháng thể hoặc các dẫn xuất của nó. Các biến thể được cải biến bằng kỹ thuật di truyền và tổng hợp (Xem patent Mỹ số US 6.331.415) bất kỳ được nêu trên cũng được dự tính bởi sáng chế. Các kháng thể đơn dòng có thể được sản xuất bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm phương pháp kháng thể đơn dòng của chuột thông thường ví dụ, kỹ thuật lai tế bào soma chuẩn của Kohler và Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Xem chung, Harlow, E. và Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Gây miễn dịch bằng protein, ví dụ, GCC hoặc phần hòa tan, hoặc protein dung hợp chứa một phần của GCC (ví dụ, TOK107-hIg), hoặc các tế bào hoặc các phân đoạn trên màng từ đó, ví dụ, các tế bào biểu hiện GCC bộc lộ trên bề mặt hoặc phần của nó (ví dụ, sản phẩm pLKTOK4 hoặc sản phẩm pLKTOK111), có thể được thực hiện bằng yếu tố sinh miễn dịch được điều chế để tiêm theo cách để kích thích đáp ứng, ví dụ, với tá dược, ví dụ, tá dược Freund hoàn chỉnh. Các tá dược thích hợp khác bao gồm, tá dược TITERMAX GOLD® (CYTRX Corporation, Los Angeles, CA) và phèn. Các yếu tố sinh miễn dịch peptit nhỏ có thể được liên kết với phân tử lớn hơn,

như hemocyanin hà (keyhole limpet hemocyanin). Chuột có thể được tiêm theo một số cách, ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong cơ ở một số vị trí, ví dụ, trong màng bụng (i.p.), phần cuối của đuôi, hoặc miếng đệm bàn chân, hoặc kết hợp các vị trí, ví dụ, i.p. và phần cuối của đuôi (BIP). Tiêm tăng cường có thể bao gồm yếu tố sinh miễn dịch giống nhau hoặc khác nhau và có thể bao gồm thêm nữa tá được, ví dụ, tá được Freund không hoàn chỉnh. Gây miễn dịch bằng ADN, ví dụ, ADN mã hóa GCC hoặc phần của nó hoặc protein dung hợp chứa GCC hoặc phần của nó (ví dụ, mã hóa TOK107-hIg) có thể được tiêm sử dụng kỹ thuật súng bắn gen. Ví dụ, ADN được nạp lên trên các hạt vàng kích thước hiển vi và được tiêm vào trong chuột thường xuyên trong khoảng thời gian ngắn.

Nhìn chung, trong đó kháng thể đơn dòng mong muốn, tế bào lai được sản xuất bằng cách dung hợp tế bào thích hợp từ dòng tế bào bất tử (ví dụ, dòng tế bào u tủy như SP2/0, P3X63Ag8.653 hoặc u tủy khác loại) với các tế bào sản xuất kháng thể. Các tế bào sản xuất kháng thể có thể thu được từ máu ngoại vi, ưu tiên là lách hoặc các hạch lympho của người, của các động vật chuyển gen kháng thể của người hoặc các động vật thích hợp khác được gây miễn dịch bằng kháng nguyên quan tâm. Các tế bào sản xuất kháng thể có nguồn gốc từ người (ví dụ, kháng thể của người) có thể được sản xuất sử dụng các phương pháp thích hợp, ví dụ, dung hợp tế bào sản xuất kháng thể của người và u tủy khác loại hoặc trioma, hoặc tạo thành dạng bất tử tế bào B của người hoạt hóa thông qua nhiễm virus Epstein Barr. (Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6.197.582 (Trakht); Niedbala *et al.*, *Hybridoma*, 17:299-304 (1998); Zanella *et al.*, *J Immunol Methods*, 156:205-215 (1992); Gustafsson *et al.*, *Hum Antibodies Hybridomas*, 2:26-32 (1991).) Các tế bào sản xuất kháng thể bất tử hoặc dung hợp (tế bào lai) có thể được phân tách sử dụng các điều kiện nuôi cấy chọn lọc, và được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn. Các tế bào sản xuất các kháng thể có tính đặc hiệu mong muốn có thể được xác định sử dụng thử nghiệm thích hợp (ví dụ, ELISA (ví dụ, bằng yếu tố sinh miễn dịch, ví dụ, TOK107-hIgG, được bất động trên lỗ vi chuẩn) hoặc bằng FACS trên tế bào biểu hiện GCC hoặc phần của nó, ví dụ, tế bào biểu hiện sản phẩm pLKTOK111). Ví dụ, nếu yếu tố sinh miễn dịch GCC chứa gốc dung hợp là chất phản ứng ái lực, gốc này có thể cho phép protein dung hợp chứa GCC hoặc phần của nó được liên kết với chất nền, ví dụ, các đĩa vi chuẩn phủ protein G, phủ streptavidin, được dẫn xuất glutathion hoặc được phủ kháng thể hoặc các chip thử

nghiệm, mà sau đó được kết hợp với huyết thanh miễn dịch hoặc môi trường có điều kiện từ tế bào lai hoặc tế bào tái tổ hợp biểu hiện kháng thể, và hỗn hợp được ủ dưới các điều kiện cảm ứng để tạo thành phức hệ (ví dụ, ở các điều kiện muối và pH sinh lý). Sau khi ủ, các lỗ của đĩa vi chuẩn hoặc các tế bào chip được rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết và liên kết bởi kháng thể kháng GCC được đo.

Theo các phương án, đối với các ứng dụng điều trị, các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể của người hoặc được làm giống như của người. Tính hữu ích của các kháng thể của người hoặc được làm giống như của người đó là chúng làm giảm khả năng hoặc loại bỏ tính sinh miễn dịch của kháng thể này trong vật chủ nhận, nhờ đó cho phép gia tăng tính sinh khả dụng và giảm khả năng gây ra phản ứng miễn dịch phụ bất lợi, do đó cho phép hữu dụng dùng nhiều kháng thể.

Các kháng thể được cải biến bao gồm các kháng thể được làm giống như của người, khảm hoặc được ghép CDR. Các đáp ứng của kháng thể kháng chuột của người (Human anti-mouse antibody-HAMA) đã dẫn đến phát triển các kháng thể khảm hoặc làm cho giống như của người khác. Trong khi các kháng thể khảm có vùng hằng định của người và vùng biến đổi của chuột, được mong đợi rằng các đáp ứng của kháng thể kháng kháng thể khảm của người (human anti-chimeric antibody-HACA) nhất định sẽ được quan sát, cụ thể là trong việc sử dụng đa liều hoặc thường xuyên kháng thể này. Sự có mặt của các protein có nguồn gốc từ chuột cống hoặc chuột này có thể dẫn đến sự thanh thải nhanh các kháng thể hoặc có thể dẫn đến sự tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng lại kháng thể này ở người bệnh. Để tránh sử dụng các kháng thể có nguồn gốc từ chuột hoặc chuột cống, các kháng thể được làm giống như của người trong đó các trình tự được đưa vào trình tự kháng thể để làm cho nó gần gũi hơn với trình tự kháng thể của người, hoặc các kháng thể của người có chiều dài đầy đủ được tạo ra bằng cách đưa chức năng của kháng thể của người vào trong loài gặm nhấm đã được phát triển để loài gặm nhấm này sẽ sản xuất các kháng thể có trình tự của người đầy đủ. Các kháng thể của người tránh được một số vấn đề nhất định liên quan đến các kháng thể chứa các vùng hằng định và/hoặc biến đổi của chuột cống, thỏ và chuột.

Các kháng thể người

Các phân tử kháng thể của người đầy đủ có thể giảm thiểu các đáp ứng sinh miễn dịch và dị ứng nội tại so với các mAb có nguồn gốc từ chuột hoặc của chuột và

do đó gia tăng hiệu quả và độ an toàn của kháng thể được dùng. Sử dụng các phân tử kháng thể của người đầy đủ có thể tạo nên tính hữu ích đáng kể trong điều trị các bệnh ở người tái phát hoặc mạn tính, như bệnh viêm, bệnh tự miễn, và bệnh ung thư, mà cần dùng kháng thể lặp lại. Do đó, các phân tử kháng thể của người có thể được sản xuất sử dụng các chủng động vật được cải biến bằng kỹ thuật di truyền trong đó sự biểu hiện gen kháng thể của động vật này bị kiểm chế và thay thế về mặt chức năng bằng sự biểu hiện gen của phân tử kháng thể của người.

Các phương pháp để sản xuất các kháng thể của người được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp để sản xuất các kháng thể của người áp dụng việc sử dụng các động vật chuyển gen, như chuột chuyển gen. Các con vật chuyển gen này chứa phần cơ bản của hệ gen sản xuất kháng thể của người, ví dụ, locut globulin miễn dịch của người mà có thể trải qua sự tái sắp xếp chức năng, được xen vào trong chính hệ gen của chúng và việc sản xuất kháng thể nội sinh của chính các con vật này được làm cho thiếu hụt sản xuất kháng thể. Các phương pháp để sản xuất các động vật chuyển gen này được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các động vật chuyển gen này có thể được tạo ra sử dụng kỹ thuật XENOMOUSE™ hoặc bằng cách sử dụng phương pháp “locut nhỏ”. Các phương pháp tạo ra XENOMICE™ được mô tả trong patent Mỹ số US 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598 và 6,075,181, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp tạo ra các động vật chuyển gen sử dụng phương pháp “locut nhỏ” được mô tả trong patent Mỹ số US 5,545,807, 5,545,806 và 5,625,825; cũng xem công bố đơn quốc tế số WO93/12227, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Chuột sản xuất kháng thể của người chuyển gen khác bao gồm HUMAB-MOUSE®, chuột chuyển nhiễm sắc thể KIRIN TC MOUSE™, KM-MOUSE® (MEDAREX, Princeton, NJ).

Sử dụng kỹ thuật động vật chuyển gen kháng thể của người, ví dụ, kỹ thuật XENOMOUSE™, các kháng thể của người có thể thu được bằng cách gây miễn dịch chuột XENOMOUSE™ (Abgenix, Fremont, Calif.) bằng kháng nguyên quan tâm. Các tế bào bạch huyết (như các tế bào B) được thu hồi (ví dụ, được phân tách từ mô lách) từ chuột biểu hiện kháng thể. Các tế bào được thu hồi này có thể được dung hợp với dòng tế bào kiểu tế bào tủy để tạo nên các dòng tế bào lai bất tử, sử dụng phương pháp chuẩn. Các dòng tế bào lai này có thể được sàng lọc và được chọn để xác định các dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên quan tâm.

Các động vật chuyển gen kháng thể của người cung cấp nguồn axit nucleic mà có thể được làm giàu các axit nucleic mã hóa các kháng thể có các đặc điểm mong muốn, như tính đặc hiệu và ái lực. Ví dụ, các axit nucleic mã hóa các kháng thể hoặc các vùng biến đổi kháng thể có thể được phân tách từ chuột chuyển gen kháng thể của người mà đã được gây miễn dịch bằng protein GCC hoặc biến thể hoặc một phần của nó. Các axit nucleic được phân lập hoặc các phần của nó (ví dụ, các phần mã hóa các vùng biến đổi, các CDR, các vùng khung) có thể được biểu hiện sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ (ví dụ, biểu hiện thực khuẩn thể) để sản xuất thư viện các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể (ví dụ, các mảnh gắn kết kháng nguyên chuỗi đơn, các mảnh gắn kết kháng nguyên chuỗi kép) mà được làm giàu các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên mà liên kết với protein GCC. Thư viện này có thể thể hiện sự đa dạng tăng (ví dụ, sự đa dạng tổ hợp thông qua sự bắt cặp các vùng biến đổi chuỗi nặng và các vùng biến đổi chuỗi nhẹ) so với kho kháng thể được sản xuất trong động vật chuyển gen kháng thể của người được gây miễn dịch. Thư viện này có thể được sàng lọc sử dụng thử nghiệm thích hợp bất kỳ (ví dụ, thử nghiệm liên kết protein GCC) để xác định các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên có các đặc điểm mong muốn (ví dụ, tính đặc hiệu, ái lực). Các axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên có các đặc điểm mong muốn có thể được thu hồi sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. (Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5.871.907 (Winter et al.) và Patent Mỹ số 6.057.098 (Buechler et al.).)

Theo phương án khác, các kháng thể này có thể được biểu hiện trong các dòng tế bào không phải là các dòng tế bào lai. Cụ thể hơn, các trình tự mã hóa các kháng thể cụ thể có thể được tách dòng từ các tế bào sản xuất các kháng thể này và được sử dụng để biến nạp vào tế bào chủ động vật có vú thích hợp. Theo phương pháp được ưu tiên, lympho bào lách và/hoặc hạch lympho của các con chuột được gây miễn dịch được phân tách từ con chuột này và được dàn lên đĩa trong các thử nghiệm mảng như được mô tả trước đây trong Babcook et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 7843-8 (1996), mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Vấn đề là, các tế bào được dàn lên đĩa thạch aga có các hồng cầu huyết của cừu, được phủ bằng kháng nguyên GCC và các tế bào tiết mAb kháng lại kháng nguyên GCC sẽ cố định bổ thể và làm tan các hồng cầu huyết ngay lập tức mà bao quanh lấy các tế bào sản xuất mAb. Các tế bào trong các mảng được thanh thải được đưa lên để xác định trình tự của các trình tự của globulin

miễn dịch và tách dòng phụ vào trong các vector biểu hiện. Các phần nối từ các tế bào chuyển nhiễm tạm thời chứa mAb đặc hiệu GCC sau đó được sàng lọc bằng ELISA và cho gắn kết với các tế bào bằng máy đo dòng tế bào. Các trình tự biến đổi, hoặc phần của nó của các kháng thể của người được tạo ra chứa các CDR mà liên kết với các epitop cụ thể có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể được cải biến. Ví dụ, các vùng biến đổi của các kháng thể được tạo ra có thể được nối vào trong catxet biểu hiện để dễ dàng chuyển các cấu trúc, biểu hiện gia tăng các cấu trúc, và/hoặc đưa các cấu trúc vào trong các vector có khả năng biểu hiện các kháng thể có chiều dài đầy đủ, xem, ví dụ, US20060147445. Theo các phương án cụ thể, catxet biểu hiện chứa vùng hằng định chuỗi nặng có isotyp IgG1.

Phương pháp kháng thể lympho bào chọn lọc (Selected Lymphocyte Antibody Method-SLAM, xem. Patent. Mỹ số. 5.627.052, Babcook et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7843-7848 (1996)) có thể cũng được sử dụng để xác định các tế bào mà có thể cung cấp kháng thể quan tâm. Trong SLAM, các tế bào B được nuôi cấy trực tiếp, do đó sử dụng kỹ thuật lai, mà thường bắt giữ chỉ phần trăm nhỏ các kháng thể thường được tạo ra ở chuột. Sử dụng các thử nghiệm dựa trên vi bản, các tế bào B được thử nghiệm nhanh trong khoảng thời gian một vài ngày. Thường là, hàng ngàn dòng tế bào vô tính phản ứng với kháng nguyên được xác định, mô tả hàng ngàn kháng nguyên đặc hiệu cụ thể, ví dụ, các kháng thể đơn dòng đặc hiệu GCC. Một số kháng thể đơn dòng phản ứng với kháng nguyên khác nhau được xác định trong một thí nghiệm thường được gia tăng gấp nhiều lần. Sau khi áp dụng các thử nghiệm dựa trên vi bản nhanh bổ sung để đo và xếp loại các kháng thể nhờ ái lực và chức năng, các dòng tế bào B vô tính riêng biệt sản xuất các kháng thể với chất lượng cực kỳ cao có thể được chọn lọc. Ngoài ra, bằng cách sử dụng bước tạo ra tế bào lai, việc sản xuất có thể di chuyển nhanh thành dòng tế bào sản xuất tái tổ hợp. Các tế bào B riêng rẽ được chọn sử dụng kỹ thuật này được phân tách và các gen kháng thể có thể được đưa trực tiếp vào trong dòng tế bào sản xuất. Dòng tế bào thu được này sau đó có thể được phát triển cho thử nghiệm lâm sàng thử nghiệm chủ yếu trong khung thời gian giống nhau như khung thời gian cần để phát triển dòng tế bào lai.

mAb 5F9 của người (IgG2, kapa) có thể được sản xuất bằng tế bào lai 5F9, cũng được đề cập là tế bào lai 46.5F9.8.2, mà được lưu giữ vào ngày 10.01.2007, đại diện của Millennium Pharmaceuticals Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, MA,

02139, USA, tại Bảo tàng lưu giữ giống Mỹ (American Type Culture Collection), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, U.S.A., dưới số lưu giữ No. PTA-8132. (Việc lưu giữ này được thực hiện theo, và thỏa mãn các yêu cầu của Hiệp ước Budapest về công nhận quốc tế lưu giữ các vi sinh vật cho mục đích thực hiện thủ tục patent.) Sáng chế đề cập đến tế bào lai 5F9, kháng thể mà tế bào này sản xuất, các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và các axit nucleic mã hóa kháng thể và các phần của nó (ví dụ, chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nặng, chuỗi nhẹ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, các CDR). Như được mô tả ở đây, tế bào lai 5F9 sản xuất kháng thể kapa IgG2.

Các kỹ thuật làm cho giống như của người và biểu hiện và các cải biến kháng thể

Như được thảo luận trên đây, có lợi đối với các kháng thể sản xuất có tính sinh miễn dịch giảm. Điều này có thể được thực hiện cùng với các kỹ thuật làm cho giống như của người và các kỹ thuật biểu hiện sử dụng các thư viện thích hợp. Sẽ được hiểu rằng các kháng thể của chuột hoặc các kháng thể từ các loài khác có thể được làm cho giống như của người hoặc được làm cho giống như của linh trưởng không phải người sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem ví dụ, Winter và Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) và Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). Các kháng thể quan tâm có thể được cải biến bằng kỹ thuật di truyền ADN tái tổ hợp để thay thế CH1, CH2, CH3, các vùng bản lề, và/hoặc vùng khung bằng trình tự của người tương ứng (xem WO 92/02190 và Patent Mỹ số 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350, và 5.777.085). Do đó, sử dụng cADN của Ig để tạo cấu trúc các gen globulin miễn dịch khảm được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Liu et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:3439 (1987) và *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). mARN được phân tách từ tế bào lai hoặc tế bào khác sản xuất kháng thể này và được sử dụng để sản xuất cADN. cADN quan tâm này có thể được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeaza sử dụng các môi đặc hiệu (Patent Mỹ số 4.683.195 và 4.683.202).

Theo cách khác, kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể (xem, ví dụ, McCafferty et al, *Nature*, 348:552- 553 (1990)) có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể của người và các mảnh kháng thể *in vitro*, từ các gen vùng biến đổi (variable-V) của globulin miễn dịch, ví dụ, từ các kho của người cho không được gây miễn dịch. Theo kỹ thuật này, các gen miền V của kháng thể được tách dòng vô tính trong khung thành thành gen protein phủ nhiều hoặc nhỏ của thể thực khuẩn sợi, như M13 hoặc fd, và

biểu hiện là các mảnh kháng thể có chức năng trên bề mặt của hạt thực khuẩn thể. Do hạt có sợi này chứa bản sao ADN chuỗi đơn của hệ gen thực khuẩn thể, các chọn lọc dựa trên đặc điểm chức năng của kháng thể này cũng dẫn đến chọn lọc gen mã hóa kháng thể biểu hiện các đặc điểm này. Do đó, thực khuẩn thể này bắt chước một số đặc điểm của tế bào B. Sự biểu hiện thực khuẩn thể có thể được thực hiện ở nhiều dạng khác nhau; để xem xét chúng xem, ví dụ, Johnson và Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571 (1993). Một vài nguồn mảnh gen V có thể được sử dụng để biểu hiện thực khuẩn thể. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) được phân tách dãy đa dạng các kháng thể kháng oxazolon từ thư viện chứa các gen V tổ hợp ngẫu nhiên nhỏ có nguồn gốc từ lách của các chuột được gây miễn dịch. Kho các gen V từ người cho không được gây miễn dịch có thể được xây dựng và các kháng thể đối với dãy gồm các kháng nguyên đa dạng (bao gồm các tự kháng nguyên) có thể được phân tách chủ yếu theo các kỹ thuật được mô tả bởi Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581- 597 (1991), hoặc Griffith et al, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). Cũng xem, Patent Mỹ số 5,565,332 và 5,573,905. Các thư viện biểu hiện có thể chứa các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của các kháng thể chứa các trình tự axit amin nhân tạo. Ví dụ, thư viện này có thể chứa các mảnh Fab chứa các CDR nhân tạo (ví dụ, các trình tự axit amin ngẫu nhiên) và các vùng khung của người (Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,300,064 (Knappik, et al.).)

Các kháng thể của người có thể cũng được tạo ra bằng các tế bào B hoạt hóa *in vitro* (xem Patent Mỹ số 5.567.610 và 5.229.275).

Các trình tự của các gen vùng hằng định của người có thể được tìm thấy trong Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H. công bố no. 91-3242. Các gen vùng C của người là dễ dàng sẵn có từ các dòng vô tính đã biết. Sự lựa chọn isotyp sẽ được hướng dẫn bằng các chức năng hiệu ứng mong muốn, như cố định bổ thể, hoặc hoạt tính trong phản ứng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Các isotyp có thể là IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Theo các phương án cụ thể, các phân tử kháng thể theo sáng chế là IgG1 và IgG2. Mỗi trong số các vùng hằng định chuỗi nhẹ của người, kappa hoặc lambda, có thể được sử dụng. Kháng thể khảm, được làm giống như của người sau đó được biểu hiện bằng các phương pháp thông thường.

Theo một số phương án, các phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể gây ra phản ứng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular

cytotoxicity-ADCC) cho các tế bào biểu hiện GCC, ví dụ, tế bào khối u. Các kháng thể có isotyp IgG1 và IgG3 là hữu ích để gây ra chức năng hiệu ứng trong khả năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, do khả năng gắn kết với thụ thể Fc của chúng. Các kháng thể có isotyp IgG2 và IgG4 là hữu ích để giảm thiểu đáp ứng ADCC do khả năng gắn kết với thụ thể Fc của chúng thấp. Theo các phương án liên quan, sự thay thế trong vùng Fc hoặc các thay đổi về thành phần glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, bằng cách tăng trưởng trong dòng tế bào nhân chuẩn được cải biến, có thể được tạo ra để tăng cường khả năng của các thụ thể Fc để nhận biết, gắn kết, và/hoặc gây ra phản ứng gây độc tế bào của tế bào mà kháng thể kháng GCC liên kết với (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 7.317.091, 5.624.821 và các công bố bao gồm WO 00/42072, Shields, et al. *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazar et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:4005-4010 (2006), Satoh et al. *Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006)). Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể có nguồn gốc từ người, kháng thể của người) có thể bao gồm sự thay thế hoặc các thay thế axit amin mà làm thay đổi hoặc làm cho phù hợp chức năng (ví dụ, chức năng hiệu ứng). Ví dụ, vùng hằng định có nguồn gốc từ người (ví dụ, vùng hằng định $\gamma 1$, vùng hằng định $\gamma 2$) có thể được thiết kế để giảm sự hoạt hóa bổ thể và/hoặc gắn kết thụ thể Fc. (Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5.648.260 (Winter et al.), 5.624.821 (Winter et al.) và 5.834.597 (Tso et al.), toàn bộ nội dung được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.) Ưu tiên là, trình tự axit amin của vùng hằng định có nguồn gốc từ người chứa sự thay thế hoặc thay thế axit amin này có ít nhất khoảng 95% chiều dài đầy đủ giống với trình tự axit amin của vùng hằng định không thay đổi có nguồn gốc từ người, ưu tiên hơn ít nhất khoảng 99% chiều dài đầy đủ giống với trình tự axit amin của vùng hằng định không thay đổi có nguồn gốc từ người.

Còn theo phương án khác, các chức năng hiệu ứng có thể cũng được thay đổi bằng cách điều chỉnh mô hình glycosyl hóa của kháng thể này. Bằng cách thay đổi nghĩa là loại bỏ một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được tìm thấy trong kháng thể, và/hoặc bổ sung một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa mà không có trong kháng thể này. Ví dụ, các kháng thể có hoạt tính ADCC gia tăng có cấu trúc hydrat cacbon hoàn thiện mà không có fucoza được gắn với vùng Fc của kháng thể này như được mô tả trong Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2003/0157108 (Presta). Cũng xem Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Glycofi

cũng đã phát triển các dòng tế bào nấm men có khả năng sản xuất các glycoform đặc hiệu của kháng thể.

Ngoài ra hoặc theo phương án khác, kháng thể có thể được tạo nên mà có kiểu glycosyl hóa thay đổi, như kháng thể giảm fucosyl hóa (hypofucosylated antibody) có lượng các gốc fucosyl giảm hoặc kháng thể có các cấu trúc GlcNac chia đôi tăng. Các mô hình glycosyl hóa thay đổi này đã được chứng minh làm gia tăng khả năng ADCC của các kháng thể. Các thay đổi hydrat cacbon này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ có bộ máy glycosyl hóa thay đổi. Các tế bào có bộ máy glycosyl hóa thay đổi đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng làm các tế bào chủ trong đó được cải biến bằng kỹ thuật di truyền để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế nhờ đó sản xuất kháng thể có sự glycosyl hóa thay đổi. Ví dụ, EP 1.176.195 của Hang et al. đã mô tả dòng tế bào có gen FUT8 bị phá vỡ chức năng, mã hóa fucosyl transferaza, các kháng thể này được biểu hiện trong dòng tế bào thể hiện sự fucosyl hóa giảm. Công bố đơn PCT số WO 03/035835 của Presta mô tả dòng tế bào CHO biến thể, các tế bào Lec13, có khả năng gắn fucoza với hydrat cacbon được liên kết Asn(297) giảm, cũng dẫn đến sự fucosyl hóa giảm các kháng thể được biểu hiện trong tế bào chủ này (cũng xem Shields, R. L. et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Công bố đơn PCT số WO 99/54342 của Umana et al. đã mô tả các dòng tế bào được cải biến bằng kỹ thuật di truyền để biểu hiện glycosyl transferaza cải biến glycoprotein (ví dụ, beta(1,4)-N axetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) sao cho các kháng thể được biểu hiện trong các dòng tế bào được cải biến di truyền thể hiện các cấu trúc GlcNac chia đôi gia tăng mà dẫn đến hoạt tính ADCC của các kháng thể này gia tăng (cũng xem, Umana et al., 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Các kháng thể được làm giống như của người có thể cũng được tạo ra sử dụng phương pháp ghép CDR. Các kỹ thuật tạo ra các kháng thể được làm giống như của người này được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhìn chung, các kháng thể được làm giống như của người được sản xuất bằng cách thu các trình tự axit nucleic mã hóa các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể mà liên kết với GCC, xác định vùng xác định hỗ trợ hoặc "CDR" trong các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và ghép các trình tự axit nucleic CDR lên trên các trình tự axit nucleic vùng khung người (Xem, ví dụ, Patent Mỹ số

4.816.567 và 5.225.539). Vị trí của các CDR và các gốc vùng khung có thể được xác định (xem, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health và Human Services, NIH Publication No. 91-3242, và Chothia, C. *et al.* *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Các phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây có các trình tự axit amin CDR và các trình tự axit nucleic mã hóa các CDR được liệt kê trong bảng 5 và 6. Theo một số phương án, các trình tự từ bảng 5 và 6 có thể được kết hợp vào trong các phân tử mà nhận biết GCC để sử dụng trong các phương pháp chữa bệnh hoặc chẩn đoán được mô tả ở đây. Vùng khung của người được chọn lọc là vùng khung thích hợp để dùng *in vivo*, nghĩa là nó không thể hiện tính sinh miễn dịch. Ví dụ, việc xác định này có thể được tạo nên bằng kinh nghiệm trước đó với việc sử dụng *in vivo* các kháng thể này và các nghiên cứu về tính tương tự axit amin. Vùng khung thích hợp có thể được chọn từ kháng thể có nguồn gốc từ người có ít nhất khoảng 65% trình tự axit amin giống, và tốt hơn là ít nhất khoảng 70%, 80%, 90% hoặc 95% trình tự axit amin giống với vùng khung nằm trong trình tự axit amin của phần tương đương (ví dụ, vùng khung) của kháng thể cho, ví dụ, các phân tử kháng thể kháng GCC (ví dụ, 3G1). Sự giống trình tự axit amin có thể được xác định sử dụng thuật toán chuỗi thẳng trình tự axit amin thích hợp, như CLUSTAL W, sử dụng các thông số mặc định. (Thompson J.D. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).)

Ngay khi các CDR và FR của kháng thể được tách dòng này mà là được làm cho giống như của người được xác định, các trình tự axit amin mã hóa các CDR được xác định và các trình tự axit nucleic tương ứng được ghép lên trên các FR người chọn lọc. Điều này có thể được thực hiện sử dụng các mối và các đoạn liên kết đã biết, sự chọn lọc các mối và các đoạn liên kết này được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tất cả các CDR của kháng thể của người cụ thể có thể được thay thế bằng ít nhất một phần của CDR không phải là người hoặc chỉ một số trong số các CDR có thể được thay thế bằng các CDR không phải của người. Chỉ cần thiết thay thế một số CDR cần để gắn kết kháng thể được làm giống như của người này với kháng nguyên được xác định trước. Sau khi các CDR được ghép lên trên FR người chọn lọc, các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ "được làm giống như của người" thu được được biểu hiện để sản xuất Fv được làm giống như của người hoặc kháng thể được làm giống như của người mà gắn kết với GCC. Ưu tiên là, kháng thể được ghép CDR

(ví dụ, được làm giống như của người) gắn kết protein GCC với ái lực tương tự như, hầu như giống với, hoặc tốt hơn so với ái lực của kháng thể cho. Điển hình là, các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm giống như của người được biểu hiện là protein dung hợp có các trình tự miền ổn định của người để thu được kháng thể nguyên vẹn gắn kết với GCC. Tuy nhiên, kháng thể Fv được làm giống như của người có thể được tạo ra mà không chứa các trình tự ổn định.

Cũng thuộc phạm vi của sáng chế là các kháng thể được làm giống như của người, trong đó các axit amin cụ thể đã được thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung. Cụ thể là, các kháng thể được làm giống như của người có thể có các thay thế axit amin trong vùng khung, như để cải thiện sự liên kết với kháng nguyên. Ví dụ, một số nhỏ chọn lọc các gốc vùng khung nhận của chuỗi globulin miễn dịch được làm giống như của người có thể được thay thế bằng axit amin cho tương ứng. Các vị trí của các sự thay thế này bao gồm các gốc axit amin liền kề với CDR, hoặc có khả năng tương tác với CDR (xem ví dụ, Patent Mỹ số 5.585.089 hoặc 5.859.205). Vùng khung nhận có thể là trình tự vùng khung kháng thể trưởng thành của người hoặc trình tự liên ứng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "trình tự liên ứng" đề cập đến trình tự được tìm thấy thường xuyên nhất, hoặc được nghĩ ra từ các gốc thông thường nhất ở mỗi vị trí trong trình tự trong vùng trong số các thành viên trong gia đình gần gũi. Số lượng các trình tự liên ứng kháng thể của người là sẵn có, bao gồm các trình tự liên ứng cho các nhóm phụ khác nhau của các vùng biến đổi của người (xem, Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Cơ sở dữ liệu Kabat và các ứng dụng của nó là có sẵn miễn phí trực tiếp, ví dụ thông qua IgBLAST tại Trung tâm thông tin Công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information), Bethesda, MD (cũng xem, Johnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Research* 29:205-206 (2001)).

Các kỹ thuật khác để làm cho kháng thể giống như của người được mô tả trong Padlan và các đồng tác giả, EP 519596 A1, được công bố ngày 23.12.1992.

Phân tử kháng thể kháng GCC bao gồm các kháng thể được làm giống như của người khác mà có thể cũng được cải biến bằng cách loại bỏ các epitop tế bào T của người đặc hiệu hoặc "loại bỏ tính sinh miễn dịch" bằng các phương pháp được bộc lộ trong công bố đơn PCT số WO 98/52976 và WO 00/34317, nội dung của các công bố

này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Vắn tắt là, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của chuột của kháng thể kháng GCC có thể được phân tích đối với các peptit mà gắn kết với MHC Lớp II; các peptit này là các epitop tế bào T tiềm năng. Để phát hiện các epitop tế bào T tiềm năng, phương pháp xây dựng mô hình máy tính được gọi là “lắp ráp peptit” có thể được áp dụng, và ngoài ra cơ sở dữ liệu về các peptit gắn kết MHC lớp II của người có thể được tra cứu đối với các motif có trong trình tự VH và VL của chuột, như được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 98/52976 và WO 00/34317. Các motif này gắn kết với bất kỳ trong số 18 allotyp DR MHC lớp II chủ yếu, và do đó cấu thành nên các epitop tế bào T tiềm năng. Các epitop tế bào T tiềm năng được phát hiện có thể được loại bỏ bằng cách thay thế số lượng nhỏ các gốc axit amin trong các vùng biến đổi, hoặc ưu tiên là, bằng các sự thay thế một axit amin. Xa nhất có thể, các thay thế bảo toàn được tạo ra, nhưng thường không dành cho axit amin có chung ở vị trí này trong các trình tự kháng thể dòng mầm người có thể được sử dụng. Các trình tự dòng mầm của người được bộc lộ trong Tomlinson, I.A. et al., *J. Mol. Biol.* 227:776-798(1992); Cook, G. P. et al., *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242(1995); Chothia, D. et al., *J. Mol. Bio.* 227:799-817(1992). Chỉ dẫn V BASE cung cấp chỉ dẫn dễ hiểu về các trình tự vùng biến đổi của globulin miễn dịch của người (được biên soạn bởi Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Sau khi VH và VL được loại bỏ miễn dịch của kháng thể kháng GCC được tạo cấu trúc bằng sự phát sinh đột biến các gen VH và VL của chuột, trình tự biến đổi được phát sinh đột biến có thể tùy ý được dung hợp với vùng hằng định của người, ví dụ, IgG1 của người hoặc các vùng hằng định κ .

Theo các phương án khác, giảm đáp ứng miễn dịch bằng kháng thể được ghép CDR có thể thu được bằng các thay đổi, ví dụ, loại bỏ, thay thế, các gốc axit amin trong các CDR (Kashmiri et al. *Methods* 36:25-34 (2005), Patent Mỹ số 6.818.749, Tan et al. *J. Immunol.* 169:1119-1125 (2006)). Ví dụ, các gốc ở các vị trí tham gia vào sự tiếp xúc với kháng nguyên tốt hơn là sẽ không được thay đổi. Điển hình là, các gốc này, các SDR, là ở các vị trí thể hiện các mức biến đổi cao trong số các kháng thể. Các trình tự liên ứng (ví dụ, SEQ ID NO:302-307, Bảng 5) có nguồn gốc, ví dụ, bằng phương pháp Clustal (Higgins D. G. et al., *Meth. Enzymol.* 266:383-402 (1996)), từ các phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, từ các kháng thể được mô tả ở đây, trợ giúp xác định các SDR. Trong các phân tử kháng thể kháng GCC của người được mô tả ở

đây, các SDR là như sau, ít nhất gốc đầu tiên hoặc theo một số phương án, bốn gốc đầu tiên của CDR1 chuỗi nặng; ít nhất phần đầu tận cùng N, ví dụ, bảy, mười hoặc 13 gốc đầu tiên của CDR2 chuỗi nặng; gần như tất cả CDR3 chuỗi nặng; đầu tận cùng C, ví dụ, sau sáu, tám, hoặc chín gốc của CDR1 chuỗi nhẹ; khoảng gốc đầu tiên, ở giữa và/hoặc cuối cùng của CDR2 chuỗi nhẹ; và hầu hết CDR3 chuỗi nhẹ, hoặc ít nhất sau gốc hai hoặc ba. Do đó, để duy trì liên kết với protein GCC sau khi làm giống như của người hoặc cải biến các phân tử kháng thể kháng GCC, các gốc SDR này trong các CDR của các phân tử kháng thể kháng GCC là ít phải tuân theo các thay đổi hơn, ví dụ, từ các gốc của chuột thành các gốc liên ứng của người so với các gốc thành các gốc khác của các CDR hoặc các vùng khung. Ngược lại, có thể có lợi khi thay đổi các gốc trong các CDR không phải của người, ví dụ, chuột thành các gốc được xác định là liên ứng trong các CDR của người, ví dụ, các CDR của các phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây (ví dụ, các trình tự được liệt kê trong Bảng 5). Ví dụ, serin có thể là gốc của người cho đầu tận cùng C của CDR1 chuỗi nặng, và/hoặc tyrosin có thể là gốc của người cho các gốc thứ hai và/hoặc thứ ba của CDR1 chuỗi nặng; CDR2 chuỗi nặng có thể kết thúc ở S-(L/V)-K-(S/G) (SEQ ID NO:312) để tương ứng với CDR của người; để tương ứng với CDR3 của người, có thể là glyxin sau từ bốn đến sáu gốc và/hoặc từ sáu đến chín gốc aspartat trong CDR3 chuỗi nặng; CDR1 chuỗi nhẹ có thể bắt đầu bằng (K/R)-(A/S)-SQS-(V/L)-(S/L) (SEQ ID NO:313) để tương ứng với các CDR của người; CDR2 chuỗi nhẹ có thể có serin trong gốc thứ ba và/hoặc arginin trong gốc thứ năm tương ứng là CDR của người; và/hoặc CDR3 chuỗi nhẹ có thể có glutamine trong gốc thứ hai và/hoặc tyrosin hoặc serin trong gốc thứ ba tương ứng với CDR của người.

Các kháng thể kháng-GCC mà không phải là kháng thể nguyên vẹn cũng là hữu ích trong sáng chế này. Các kháng thể này có thể có nguồn gốc từ các kháng thể bất kỳ được mô tả trên đây. Các phân tử kháng thể hữu ích thuộc dạng này bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một chứa các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai gồm hai mảnh Fab được liên kết bằng cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm các miền VH và CH1; (iv) mảnh Fv gồm các miền VL và VH của một nhánh của kháng thể, (v) mảnh dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)), chứa miền VH; (vii) kháng thể chuỗi nặng có chức năng miền đơn, chứa miền VHH (được biết là thể nano “nanobody”) xem ví dụ, Cortez-Retamozo, et al., *Cancer Res.* 64: 2853-

2857(2004), và các tài liệu được viện dẫn ở đây; và (vii) CDR phân tách, ví dụ, một hoặc nhiều CDR được phân tách cùng với khung thích hợp để tạo nên mảnh gắn kết kháng nguyên. Hơn nữa, mặc dù hai miền của mảnh Fv, VL và VH, được mã hóa bằng các gen tách biệt, chúng có thể được nối, sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng đoạn liên kết tổng hợp cho phép chúng được tạo nên là chuỗi protein đơn trong đó các vùng VL và VH bắt cặp để tạo thành phân tử hóa trị một (được biết là Fv chuỗi đơn (scFv); xem ví dụ, Bird et al. *Science* 242:423-426 (1988); và Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng nhằm để được bao hàm trong thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể. Các mảnh kháng thể này thu được sử dụng các kỹ thuật thông thường được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các mảnh này được sàng lọc để dùng theo phương pháp tương tự như là các kháng thể nguyên vẹn. Mảnh kháng thể, như Fv, F(ab')₂ và Fab có thể được tạo ra bằng cách phân giải protein nguyên vẹn, ví dụ bằng proteaza hoặc phân giải hóa học.

Theo các phương án, một số hoặc tất cả các trình tự CDR, của một hoặc cả hai chuỗi nặng và nhẹ, có thể được sử dụng trong phân tử kháng thể khác, ví dụ, trong phân tử kháng thể được ghép CDR, làm giống như của người, hoặc khảm.

Các phương án bao gồm phân tử kháng thể chứa các CDR đầy đủ, ví dụ, tất cả sáu CDR từ một trong số tế bào lai của người, lympho bào chọn lọc, hoặc các kháng thể chuột được đề cập trên đây để cho phép gắn kết với GCC bề mặt tế bào.

Theo một phương án về các CDR, ví dụ, tất cả HCDR, hoặc tất cả LCDR, hoặc tất cả sáu, được gắn trong (các) vùng khung của người hoặc có nguồn gốc từ người. Các ví dụ về các vùng khung của người bao gồm các trình tự vùng khung dòng mầm của người, các trình tự dòng mầm của người mà đã được thành thực ái lực (*in vivo* hoặc *in vitro*), hoặc các trình tự của người tổng hợp, ví dụ, các trình tự liên ứng. Theo một phương án, vùng khung chuỗi nặng là vùng khung IgG1 hoặc IgG2. Theo một phương án, vùng khung chuỗi nhẹ là vùng khung kappa.

Theo một phương án về phân tử kháng thể kháng-GCC, ví dụ, phân tử kháng thể được ghép CDR hoặc được làm cho giống như của người, chứa đầy đủ các CDR, ví dụ, tất cả sáu CDR từ một trong số các kháng thể được mô tả ở đây, ví dụ, trình tự được liệt kê trong bảng 5, cho phép gắn kết với GCC. (Các trình tự axit nucleic điển

hình có thể mã hóa các trình tự axit amin CDR được liệt kê trong bảng 5, được đề xuất, trong bảng 6 ở đây). Trong các phương án cụ thể, các phân tử kháng thể kháng GCC có thể chứa các CDR của 5F9 hoặc Abx-229.

Mảnh kháng thể để sử dụng trong chữa bệnh hoặc chẩn đoán *in vivo* có thể có lợi từ các cải biến cải thiện thời gian bán hủy trong huyết thanh của chúng. Các gốc hữu cơ này nhằm để gia tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh *in vivo* của kháng thể này có thể bao gồm một, hai hoặc nhiều gốc mạch thẳng hoặc phân nhánh được chọn từ nhóm polyme kị nước (ví dụ, polyme mạch thẳng hoặc phân nhánh (ví dụ, polyalkan glycol như polyetylene glycol, monometoxy-polyetylen glycol và polyme tương tự), hydrat cacbon (ví dụ, dextran, xenluloza, polysacarit và chất tương tự), polyme của axit amin kị nước (ví dụ, polylysin, polyaspartat và axit amin tương tự), polyalkan oxit và polyvinyl pyrrolidon), nhóm axit béo (ví dụ, axit mono-carboxylic hoặc axit di-carboxylic), nhóm este axit béo, nhóm lipid (ví dụ, nhóm diaxylglyxerol, nhóm sphingolipit (ví dụ, ceramidyl)) hoặc nhóm phospholipit (ví dụ, nhóm phosphatidyl etanolamin). Ưu tiên là, gốc hữu cơ này được liên kết với vị trí được xác định trước trong đó gốc hữu cơ không bị hư hại chức năng (ví dụ, giảm ái lực gắn kết kháng nguyên) của thể liên hợp miễn dịch thu được so với gốc kháng thể không được tiếp hợp. Gốc hữu cơ này có thể có trọng lượng phân tử là nằm trong khoảng từ 500 Da đến khoảng 50.000 Da, ưu tiên là khoảng 2000, 5000, 10.000 hoặc 20.000 Da. Các ví dụ và các phương pháp để cải biến polypeptit, ví dụ, các kháng thể, có các gốc hữu cơ có thể được tìm thấy, ví dụ, trong Patent Mỹ số 4.179.337 và 5.612.460, Công bố đơn PCT số WO 95/06058 và WO 00/26256, và Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 20030026805.

Phân tử kháng thể kháng GCC có thể chứa tất cả, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi, của một hoặc cả hai chuỗi nặng và nhẹ, của một trong số tế bào lai của người được đề cập trên đây, lympho bào chọn lọc, hoặc các kháng thể chuột.

Theo một phương án, trình tự axit amin chuỗi nhẹ là (a) có thể khác một trong số (các) trình tự axit amin tham chiếu được đề cập đến trong (a)(i-ii) ở khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 10, hoặc 15 gốc. Theo một phương án, các sự khác biệt là các sự thay thế bảo toàn. Trong các phương án, các sự khác biệt là ở trong các vùng khung. Theo một phương án, trình tự axit amin chuỗi nặng là (b) có thể khác một trong số (các) trình tự

axit amin tham chiếu được đề cập đến trong (b)(i-ii) ở khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 10, hoặc 15 gốc. Theo các phương án, các khác biệt là sự thay thế bảo toàn. Theo các phương án, các khác biệt là trong vùng khung.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng GCC chứa một hoặc cả hai:

(a) trình tự axit amin chuỗi nhẹ gồm tất cả, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, là, (i) trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ từ bảng 3, ví dụ, SEQ ID NO:20, hoặc (ii) trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi trình tự nucleotit từ bảng 4, ví dụ, SEQ ID NO:19; và

(b) trình tự axit amin chuỗi nặng gồm tất cả, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên là (i) trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng từ bảng 3, ví dụ, SEQ ID NO:18, hoặc (ii) trình tự axit amin chuỗi nặng được mã hóa bởi trình tự nucleotit từ bảng 4, ví dụ, SEQ ID NO:17.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng GCC chứa một hoặc cả hai:

a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có ít nhất 85, 90, 95, 97 hoặc 99 % tương đồng với vùng biến đổi chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, một trong số tế bào lai của người, lympho bào chọn lọc hoặc kháng thể chuột được đề cập trên đây; và

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có ít nhất 85, 90, 95, 97 hoặc 99 % tương đồng với vùng biến đổi chuỗi nặng của phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, một trong số tế bào lai của người, lympho bào chọn lọc hoặc kháng thể chuột được đề cập trên đây.

Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi của tế bào lai của người, lympho bào chọn lọc hoặc kháng thể chuột có thể được tìm thấy trong bảng 3.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng GCC là phân tử kháng thể 5F9 và bao gồm một hoặc cả hai: a) tất cả hoặc mảnh của vùng hằng định chuỗi nặng từ SEQ ID NO: 231; và b) tất cả hoặc mảnh của vùng hằng định chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO: 233.

Theo phương án khác, phân tử kháng thể kháng GCC là kháng thể Abx-229 và bao gồm một hoặc cả hai: a) tất cả hoặc mảnh gắn kết GCC của vùng biến đổi chuỗi

nặng từ SEQ ID NO: 46; và b) tất cả hoặc mảnh gắn kết GCC của vùng biến đổi chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO: 48.

Theo một phương pháp, các trình tự liên ứng mã hóa vùng J chuỗi nặng và nhẹ có thể được sử dụng để thiết kế các oligonucleotit để sử dụng làm các mối để đưa các vị trí giới hạn hữu ích vào trong vùng J này để nối sau đó các mảnh vùng V với các mảnh vùng C người. ADN bổ trợ vùng C có thể được thay đổi bằng cách gây phát sinh đột biến trực tiếp vị trí để đặt vị trí giới hạn ở vị trí tương tự trong trình tự người.

Các vector biểu hiện bao gồm các plasmit, retrovirus, cosmit, YAC, EBV episom dẫn xuất, và loại tương tự. Vector thích hợp là vector mã hóa trình tự globulin miễn dịch CH hoặc CL của người hoàn chỉnh có chức năng, có các vị trí giới hạn thích hợp được cải biến bằng kỹ thuật di truyền để trình tự VH hoặc VL bất kỳ có thể được xen và biểu hiện dễ dàng. Trong các vector này, việc nối thường xảy ra giữa vị trí cho nối trong vùng J được xen vào và vị trí chấp nhận nối đã có trước trong vùng C của người, và cũng ở các vùng nối mà có trong các exon CH người. Các vector biểu hiện thích hợp có thể chứa một số thành phần, ví dụ, điểm khởi đầu sao chép, gen dấu chuẩn chọn lọc, một hoặc nhiều yếu tố điều khiển biểu hiện, như yếu tố điều khiển phiên mã (ví dụ, trình tự khởi đầu, trình tự tăng cường, trình tự kết thúc) và/hoặc một hoặc nhiều tín hiệu dịch mã, trình tự tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu, và trình tự tương tự. Sự polyadenyl hóa và sự kết thúc phiên mã diễn ra ở các vị trí nhiễm sắc thể nguyên thể về phía đầu 3' của các vùng mã hóa. Kháng thể khả năng thu được có thể được nối với trình tự khởi đầu mạnh bất kỳ. Các ví dụ về các vector thích hợp mà có thể được sử dụng bao gồm các vector thích hợp cho các vật chủ có vú và được dựa trên các hệ thống sao chép virus, như virus khỉ 40 (simian virus 40-SV40), virus sarcoma Rous (Rous sarcoma virus-RSV), adenovirus 2, virus u nhú bò (bovine papilloma virus-BPV), thể đột biến BK papovavirus (papovavirus BK mutant-BKV), hoặc cytomegalovirus (cytomegalovirus-CMV) của chuột và người, và virus Moloney gây bệnh bạch cầu ở chuột (moloney murine leukemia virus-MMLV), trình tự khởi đầu Ig nguyên thể, v.v. Nhiều vector thích hợp khác nhau được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các vector được duy trì trong một bản sao hoặc nhiều bản sao, hoặc nó trở nên được xen vào trong nhiễm sắc thể tế bào chủ, ví dụ, thông qua LTR, hoặc thông qua các nhiễm sắc thể nhân tạo được cải biến bằng kỹ thuật di truyền có nhiều vị trí xen (Lindenbaum et al. *Nucleic Acids Res.* 32:e172 (2004), Kennard et al.

Biotechnol. Bioeng. Online May 20, 2009). Các ví dụ nữa về các vector thích hợp được liệt kê trong phần sau.

Do đó, sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể (ví dụ, kháng thể khảm, làm cho giống như của người, người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của các kháng thể này), chuỗi kháng thể (ví dụ, chuỗi nặng, chuỗi nhẹ) hoặc phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể mà gắn kết protein GCC.

Sự biểu hiện trong các tế bào chủ nhân chuẩn là hữu ích bởi vì các tế bào này là có khả năng hơn các tế bào nhân chuẩn để quần tụ và tiết kháng thể có hoạt tính miễn dịch và gấp nếp thích hợp. Tuy nhiên, kháng thể bất kỳ được sản xuất là bất hoạt do gấp nếp không thích hợp có thể được phục hồi hoạt tính theo các phương pháp đã biết (Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, pp. 459-89 (1982)). Có thể là các tế bào chủ này sẽ sản xuất các phần của các kháng thể nguyên vẹn, như các dime chuỗi nhẹ hoặc các dime chuỗi nặng, mà cũng là chất tương tự kháng thể theo sáng chế.

Hơn nữa, như được mô tả đầu đó ở đây, các kháng thể của người hoặc các kháng thể từ các loài khác có thể được tạo ra thông qua các kỹ thuật kiểu biểu hiện, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, biểu hiện thực khuẩn thể, biểu hiện retrovirus, biểu hiện ribosom, và kỹ thuật khác sử dụng các kỹ thuật được biết nhiều trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các phân tử thu được có thể được đưa đến quy trình thành thực chức năng bổ sung, như thành thực ái lực, các kỹ thuật này được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) and Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992), Hanes and Pluchau *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (ribosomal display), Parmley and Smith *Gene* 73:305-318 (1988) (phage display), Scott *TIBS* 17:241-245 (1992), Cwirla et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378-6382 (1990), Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty *TIBTECH* 10:80-84 (1992), và Patent Mỹ số 5.733.743. Nếu các kỹ thuật biểu hiện được sử dụng để sản xuất kháng thể không phải là của người, các kháng thể này có thể là giống như của người như được mô tả trên đây.

Sẽ được hiểu rằng các kháng thể được tạo ra ban đầu không cần chứa isotyp mong muốn cụ thể nhưng đúng hơn là kháng thể như được tạo ra có thể chứa isotyp bất kỳ. Ví dụ, kháng thể được sản xuất bởi tế bào lai 5F9 (số ký hiệu lưu giữ ATCC no. PTA-8132) có isotyp IgG2. Isotyp này của kháng thể có thể được chuyển sau đó, ví dụ, thành IgG1 hoặc IgG3 để gây ra đáp ứng ADCC khi kháng thể này liên kết GCC trên tế bào, sử dụng kỹ thuật thông thường được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này bao gồm sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp trực tiếp (xem ví dụ, Patent Mỹ số 4.816.397), các kỹ thuật dung hợp tế bào-tế bào (xem ví dụ, Patent Mỹ số 5.916.771), bao gồm các kỹ thuật khác. Trong kỹ thuật dung hợp tế bào-tế bào, dòng tế bào u tủy hoặc dòng tế bào khác được tạo ra chứa chuỗi nặng có isotyp mong muốn bất kỳ và dòng tế bào u tủy khác hoặc dòng tế bào khác được tạo ra chứa chuỗi nhẹ này. Các tế bào này có thể sau đó được dung hợp và dòng tế bào biểu hiện kháng thể nguyên vẹn có thể được phân tách.

Theo các phương án nhất định, phân tử kháng thể GCC là kháng thể IgG1 của người kháng GCC. Vì các kháng thể này chứa liên kết mong muốn với phân tử GCC, một kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này có thể được chuyển isotyp dễ dàng để tạo ra isotyp IgG4 của người, ví dụ, trong khi vẫn chứa vùng biến đổi tương tự (mà xác định tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể, trong chừng mực nhất định). Do đó, vì các kháng thể ứng viên được tạo ra mà đáp ứng các thuộc tính "cấu trúc" mong muốn như được thảo luận trên đây, chúng có thể thường được cung cấp với ít nhất các thuộc tính "chức năng" bổ sung nhất định được mong muốn thông qua sự chuyển isotyp.

Theo một phương án, vùng biến đổi hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được nối với vùng hằng định (hoặc mảnh của nó) khác với vùng hằng định mà nó được tạo ra với, ví dụ, vùng hằng định (hoặc mảnh của nó) của kháng thể khác hoặc vùng hằng định tổng hợp (hoặc mảnh của nó). Theo các phương án, vùng hằng định là vùng hằng định của IgG1 hoặc IgG2 (hoặc mảnh của nó). Sự thay đổi trình tự có thể được tạo ra trong vùng hằng định hoặc biến đổi để thay đổi hoạt tính hiệu ứng của phân tử kháng thể.

Thiết kế và tạo ra các liệu pháp khác

Các kháng thể được sản xuất và được mô tả ở đây đối với GCC cung cấp thiết kế về các phương thức chữa bệnh khác bao gồm các kháng thể khác, các chất đối

kháng khác hoặc các gốc hóa học khác với các kháng thể được đề cập. Các phương thức này bao gồm, không giới hạn về các kháng thể có hoạt tính hoặc chức năng gắn kết tương tự, kháng thể chữa bệnh hữu ích, như các kháng thể đặc hiệu kép, các thể liên hợp miễn dịch, và các dược chất được đánh dấu phóng xạ, tạo nên các peptit chữa bệnh, cụ thể là các kháng thể nội bào (intrabody), và các phân tử nhỏ. Hơn nữa, như được thảo luận trên đây, chức năng hiệu ứng của các kháng thể theo sáng chế có thể được thay đổi bằng cách chuyển isotyp thành IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE, hoặc IgM cho các mục đích sử dụng chữa bệnh khác nhau.

Đề cập đến các kháng thể đặc hiệu kép, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bao gồm (i) hai kháng thể, một kháng thể có tính đặc hiệu với GCC và kháng thể kia là phân tử thứ hai mà được tiếp hợp cùng nhau, (ii) một kháng thể có một chuỗi đặc hiệu với GCC và chuỗi thứ hai đặc hiệu với phân tử thứ hai, hoặc (iii) kháng thể chuỗi đơn có tính đặc hiệu đối với GCC và phân tử còn lại. Các kháng thể đặc hiệu kép này có thể được tạo ra sử dụng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được sản xuất bằng cách liên kết chéo với hai hoặc nhiều kháng thể (có dạng giống nhau hoặc có dạng khác nhau). Các chất liên kết chéo thích hợp bao gồm các chất là có hai chức năng khác nhau, có hai nhóm phản ứng khác biệt được tách biệt bằng đoạn liên kết thích hợp (ví dụ, m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide este) hoặc có hai chức năng giống nhau (ví dụ, disuccinimidyl suberate). Các đoạn liên kết này là sẵn có từ Pierce Chemical Company, Rockford, IL. Cũng xem, ví dụ, Fanger et al. *Immunomethods* 4:72-81 (1994) và Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) and Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992) và đề cập đến (iii) xem ví dụ, Traunecker et al. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992). Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992).

Ngoài ra, các dạng thể kapa ‘kappabodies’ (Ill. et al. “Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions” *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), dạng thể nhỏ “Minibody” (Martin et al. *EMBO J* 13:5303-9 (1994), Patent Mỹ số 5.837.821), dạng dime của mảnh globulin miễn dịch “diabody” (Holliger et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448 (1993)), hoặc “Janusins” (Traunecker et al. *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) và Traunecker et al. *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)) có thể cũng được điều chế.

Axit nucleic và polypeptit

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến các trình tự polynucleotit và polypeptit mã hóa hoặc biểu hiện các phân tử kháng thể được mô tả ở đây. Các polynucleotit này mã hóa cả hai vùng biến đổi và ổn định của mỗi phân tử chuỗi nặng và nhẹ, mặc dù các kết hợp khác có thể cũng được dự tính bởi sáng chế phù hợp với các chế phẩm được mô tả ở đây. Sáng chế cũng dự tính các mảnh oligonucleotit có nguồn gốc từ các polynucleotit được bộc lộ này và các trình tự axit nucleic bổ trợ với các polynucleotit này.

Các polynucleotit có thể ở dạng ARN hoặc ADN. Polynucleotit ở dạng ADN, cADN, ADN hệ gen, các chất tương tự axit nucleic và ADN tổng hợp là trong phạm vi của sáng chế. ADN có thể cũng là sợi đôi hoặc sợi đơn, và nếu là sợi đơn, có thể là sợi mã hóa (có nghĩa) hoặc sợi không mã hóa (đồng nghĩa). Trình tự mã hóa mã hóa polypeptit có thể là giống với trình tự mã hóa được đề xuất ở đây hoặc có thể là trình tự mã hóa khác biệt mã hóa trình tự, do sự dư thừa hoặc sự thoái biến mã di truyền, mã hóa polypeptit tương tự như ADN được đề xuất ở đây.

Trong các phương án được đề xuất, polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nặng và ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nhẹ của sáng chế, ví dụ, như được tóm tắt trong bảng 4.

Sáng chế cũng bao gồm các polynucleotit biến thể chứa các cải biến như sự mất đoạn, sự thay thế hoặc sự bổ sung polynucleotit, và sự cải biến polypeptit bất kỳ thu được từ trình tự polynucleotit biến thể. Polynucleotit theo sáng chế có thể cũng có trình tự mã hóa mà là biến thể của trình tự mã hóa được đề xuất ở đây. Ví dụ, polynucleotit biến thể có thể có ít nhất 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 97% giống với polynucleotit được liệt kê trong bảng 4. Theo các phương án, polynucleotit biến thể này mã hóa phân tử kháng thể kháng GCC.

Sáng chế đề cập tiếp đến các polypeptit là các kháng thể theo sáng chế cũng như các mảnh, chất tương tự và các dẫn xuất của các polypeptit này. Các polypeptit theo sáng chế có thể là các polypeptit tái tổ hợp, các polypeptit được sản xuất tự nhiên hoặc các polypeptit tổng hợp. Mảnh, dẫn xuất hoặc chất tương tự của polypeptit theo sáng chế có thể là mảnh, dẫn xuất hoặc chất tương tự trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin bảo toàn và không bảo toàn (tốt hơn là gốc axit

amin bảo toàn) và gốc axit amin được thay thế này có thể hoặc không thể là gốc axit amin được mã hóa bởi mã di truyền; hoặc nó có thể là gốc axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin bao gồm nhóm phân tử thế; hoặc nó có thể là gốc axit amin trong đó polypeptit này được dung hợp với hợp chất khác, như hợp chất làm gia tăng thời gian bán hủy của polypeptit này (ví dụ, polyethylene glycol); hoặc nó có thể là gốc axit amin trong đó các axit amin bổ sung được dung hợp với polypeptit này, như trình tự dẫn đầu hoặc trình tự tiết hoặc trình tự được sử dụng để tinh chế polypeptit này hoặc trình tự tiền protein. Các mảnh, các dẫn xuất và chất tương tự này là trong phạm vi của sáng chế. Theo các khía cạnh khác nhau, polypeptit theo sáng chế là sản phẩm được tinh chế một phần, hoặc sản phẩm tinh khiết

Polypeptit theo sáng chế có thể có trình tự axit amin mà là giống với trình tự axit amin của các kháng thể được mô tả ở đây, ví dụ, được tóm tắt trong bảng 2 hoặc 3, hoặc trình tự khác biệt bởi các biến đổi nhỏ do một hoặc nhiều thay thế axit amin. Sự biến đổi này có thể là “sự thay đổi bảo toàn” thường nằm trong khoảng từ 1 đến 5 axit amin, trong đó axit amin được thay thế này có cấu trúc hoặc đặc điểm hóa học tương tự, ví dụ, sự thay thế leuxin bằng isoleuxin hoặc threonin bằng serin; sự thay thế lysin bằng arginin hoặc histidin. Ngược lại, các biến đổi có thể bao gồm các sự thay đổi không bảo toàn, ví dụ, sự thay thế glyxin bằng tryptophan. Các biến đổi nhỏ tương tự có thể cũng bao gồm loại bỏ hoặc xen axit amin hoặc cả hai. Hướng dẫn để xác định gốc axit amin nào và bao nhiêu gốc axit amin có thể được thay thế, xen vào, hoặc loại bỏ không làm thay đổi hoạt tính sinh học hoặc miễn dịch có thể được tìm thấy sử dụng các phần mềm máy tính được biết trong lĩnh vực, ví dụ phần mềm DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.).

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả các axit nucleic được phân lập và/hoặc tái tổ hợp mã hóa phân tử kháng thể kháng GCC. Theo các phương án, axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều phân tử kháng thể, chuỗi nặng, chuỗi nhẹ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng biến đổi chuỗi nặng, các phần của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của các phân tử kháng thể được mô tả ở đây (ví dụ, mảnh vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà khi được bắt cặp với vùng biến đổi chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ là gắn kết kháng nguyên, hoặc mảnh vùng biến đổi chuỗi nặng mà khi bắt cặp với vùng biến đổi chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ là gắn kết kháng nguyên), và các CDR. Các phương án bao gồm các axit nucleic được bố trí trong các vector, ví dụ, các vector biểu hiện. Theo các

phương án cụ thể, sáng chế bao gồm các plasmit pTOK58D-5F9LC và pTOK58D-5F9HC. Hơn nữa, sáng chế bao hàm các phân tử kháng thể được sản xuất bởi các tế bào chủ, ví dụ, biểu hiện các phân tử kháng thể được mã hóa bởi plasmit pTOK58D-5F9LC và pTOK58D-5F9HC.

Theo một phương án, đề xuất vector, ví dụ vector biểu hiện chứa một hoặc cả hai:

các trình tự mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ, ví dụ, các trình tự được liệt kê trong Bảng 4, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc một, hai hoặc ba CDR của chuỗi nhẹ (và tùy ý vùng khung), được mô tả ở đây, ví dụ, trong Bảng 6; và

các trình tự mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng, ví dụ, các trình tự được liệt kê trong Bảng 4, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc một, hai hoặc ba CDR của chuỗi nặng (và tùy ý vùng khung), được mô tả ở đây, ví dụ, trong Bảng 6.

Theo các phương án được đề xuất, polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể theo sáng chế. Trong các phương án được đề xuất, polypeptit có thể mã hóa ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nặng và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể theo sáng chế.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng GCC chứa một hoặc cả hai:

(a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được mã hóa bằng axit nucleic mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt chọn lọc với, (i) phần bổ sung của trình tự axit nucleic mã hóa phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây, ví dụ, trong Bảng 4, hoặc (ii) trình tự axit nucleic bất kỳ mã hóa chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, một trong số tế bào lai của người được tham khảo ở đây, lympho bào chọn lọc, hoặc các kháng thể chuột được tóm tắt trong Bảng 1 và 2; và

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được mã hóa bằng axit nucleic mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt chọn lọc với, (i) phần bổ sung của trình tự axit nucleic mã hóa phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây, ví dụ, trong Bảng 4, hoặc (ii) trình tự axit nucleic bất kỳ mã hóa chuỗi nặng của phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, một trong số tế bào lai của người

được tham khảo ở đây, lympho bào chọn lọc, hoặc các kháng thể chuột được tóm tắt trong Bảng 1 và 2.

Theo một phương án, các điều kiện nghiêm ngặt chọn lọc là các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc rất cao, ví dụ, như các điều kiện được mô tả ở đây.

Theo các khía cạnh bổ sung, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin của trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được mã hóa bằng ADN có số truy cập ATCC PTA-8132. Theo các khía cạnh bổ sung khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin của trình vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được mã hóa bằng ADN có số truy cập ATCC PTA-8132.

Sáng chế cũng đề xuất các vector chứa các polynucleotit theo sáng chế, tế bào chủ được cải biến bằng kỹ thuật di truyền bằng các vector theo sáng chế và sản xuất kháng thể theo sáng chế bằng kỹ thuật tái tổ hợp.

Trình tự ADN thích hợp có thể được xen vào trong vector này bằng các quy trình khác nhau. Nhìn chung, trình tự ADN được xen vào trong các vị trí endonucleaza giới hạn thích hợp bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trình tự polynucleotit trong vector biểu hiện thường được liên kết linh hoạt với trình tự điều khiển biểu hiện thích hợp (nghĩa là, trình tự tăng cường) điều khiển sự tổng hợp mARN. Các ví dụ về các trình tự khởi đầu, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, LTR virut sarcoma Rous hoặc trình tự khởi đầu của, SV40 sớm hoặc muộn, trình tự khởi đầu lac hoặc trp của *E. coli*, trình tự khởi đầu P_L của thực khuẩn thể lambda và các trình tự khởi đầu khác được biết để điều khiển sự biểu hiện các gen trong các tế bào chưa có nhân điển hình (ví dụ trình tự khởi đầu, tac, T3, T7 cho *E. coli*) hoặc nhân chuẩn (ví dụ, trình tự khởi đầu xytomegalovirut, trình tự khởi đầu muộn adenovirut, trình tự khởi đầu EF-1a) hoặc các virut của chúng. Vector biểu hiện cũng chứa vị trí gắn kết ribosom cho sự khởi đầu phiên mã và trình tự kết thúc dịch mã. Vector này có thể cũng bao gồm các trình tự thích hợp để khuếch đại sự biểu hiện. Ví dụ, vector này có thể chứa trình tự tăng cường, là các trình tự ADN có nguồn gốc từ virut kích thích sự dịch mã, như các gen có nguồn gốc từ virut ở khỉ như SV40, virut polyoma, xytomegalovirut, virut papilloma ở bò hoặc virut sarcoma Moloney, hoặc điểm khởi đầu hệ gen. Vector này ưu tiên là cũng chứa điểm khởi đầu sao chép. Vector này cũng

được xây dựng để chứa điểm khởi đầu sao chép ngoại lai hoặc, như điểm khởi đầu sao chép có thể có nguồn gốc từ SV40 hoặc nguồn virus khác, hoặc bằng cơ chế sao chép nhiễm sắc thể tế bào chủ.

Ngoài ra, các vector tùy ý chứa gen dấu chuẩn để chọn lọc các tế bào chủ được chuyển nhiễm như các gen dấu chuẩn dihydrofolat reductaza cho phép chọn lọc metotrexat trong nhiều vật chủ khác nhau, hoặc các chất kháng sinh, như gen β -lactamaza (kháng lại ampicillin), gen *Tet* (để kháng tetracyclin) được sử dụng trong các tế bào chưa có nhân điển hình hoặc neomycin, GA418 (genetixin, dẫn xuất neomycin) gpt (axit mycophenolic), ampicillin, hoặc các gen kháng hygromycin, hoặc các gen bổ sung vào tổn thương di truyền của tế bào chủ như khi không có thymidin kinaza, hypoxanthin phosphoribosyl transferaza, dihydrofolat reductaza, v.v.. Các gen mã hóa sản phẩm gen của các dấu chuẩn dinh dưỡng thụ động của vật chủ (ví dụ, *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) thường được sử dụng làm các dấu chuẩn chọn lọc trong nấm men.

Để thu được các kháng thể theo sáng chế, một hoặc nhiều trình tự polynucleotit mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ và các vùng hằng định chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể theo sáng chế nên được đưa vào trong vector. Trình tự polynucleotit mã hóa các chuỗi nhẹ và nặng của các kháng thể theo sáng chế có thể được đưa vào trong một hoặc nhiều vector và sau đó được đưa vào trong các tế bào chủ.

Các vector biểu hiện thích hợp để biểu hiện trong các tế bào động vật có vú bao gồm, ví dụ, pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcADN3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 (Goldman, L.A., *et al.*, *Biotechniques*, 21:1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GIBCO division of Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), pEF-Bos (Mizushima, S., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)), Bicistronic GPEX® Retrovector (Gala Biotech, Middleton, WI) và vector tương tự. Các vector biểu hiện thích hợp để sử dụng trong các vật chủ biểu hiện khác nhau, như các tế bào chưa có nhân điển hình (*E. coli*), các tế bào côn trùng (các tế bào *Drosophila* Schnieder S2, Sf9) và nấm men (*P. methanolicus*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) là cũng có sẵn. Các vector điển hình là pLK TOK58 (trình tự Fc IgG1 kiểu đại) và pLK TOK59 (trình tự Fc IgG1 đột biến) (xem công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 20060147445).

Như sẽ được hiểu, các kháng thể theo sáng chế có thể được biểu hiện trong các dòng tế bào không phải là các dòng tế bào lai. Các trình tự mã hóa cADN hoặc dòng vô tính hệ gen cho các kháng thể cụ thể có thể được sử dụng cho các tế bào chủ động vật có vú hoặc không phải động vật có vú thích hợp. Sự biến nạp có thể bằng phương pháp đã biết bất kỳ để đưa các polynucleotit vào trong tế bào chủ, bao gồm, ví dụ đóng gói polynucleotit trong virus (hoặc vào trong vector virus) và tải nạp tế bào chủ với virus (hoặc vector) hoặc bằng các quy trình chuyển nhiễm được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, để đưa các polynucleotit khác loại vào trong các tế bào động vật có vú, ví dụ, chuyển nhiễm qua trung gian dextran, kết tủa canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian polybren, dung hợp protoplast, điện chuyển, đóng gói (các) polynucleotit vào trong các liposom và vi tiêm trực tiếp phân tử ADN. Quy trình biến nạp được sử dụng phụ thuộc vào tế bào chủ được biến nạp. Các phương pháp để đưa các polynucleotit khác loại vào trong tế bào động vật có vú được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, sự chuyển nhiễm qua trung gian dextran, sự kết tủa canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian polybren, dung hợp protoplast, điện chuyển, sự bắn phá hạt, bao nang (các) polynucleotit trong các liposom, các thể liên hợp peptit, dendrime, và vi tiêm trực tiếp ADN vào trong nhân.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả, các tế bào chủ chứa axit nucleic được mô tả ở đây. Theo các phương án, tế bào chủ biểu hiện phân tử kháng thể, hoặc thành phần của nó được mô tả ở đây. Do đó, phương án nữa đề xuất phương pháp tạo ra phân tử kháng thể, ví dụ phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây, ví dụ phân tử kháng thể của người hoặc làm cho giống như của người bao gồm duy trì tế bào chủ này dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện, nhờ đó (các) chuỗi globulin miễn dịch được biểu hiện và phân tử kháng thể được tạo ra. Phương án nữa đề xuất tế bào chủ chứa các vector biểu hiện trước đó bất kỳ mã hóa các trình tự kháng thể chuỗi nhẹ và nặng bất kỳ. Tế bào chủ có thể là tế bào nhân chuẩn, ví dụ, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào nấm men, hoặc tế bào chưa có nhân điển hình, ví dụ, *E. coli*. Ví dụ, tế bào động vật có vú có thể là tế bào nuôi cấy hoặc dòng tế bào. Các tế bào động vật có vú điển hình bao gồm các dòng tế bào lympho bào (ví dụ, NS0), các tế bào trứng của chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO), các tế bào COS. Theo các phương án cụ thể, tế bào chủ nuôi cấy là tế bào COS chứa các trình tự axit nucleic mã hóa phân tử kháng thể 5F9. Theo phương án khác, tế bào chủ là khối tế bào lai 5F9

(PTA-8132). Hơn nữa, các tế bào bao gồm các tế bào noãn bào, và các tế bào từ động vật chuyển gen, ví dụ, tế bào biểu mô động vật có vú. Ví dụ, các axit nucleic mã hóa phân tử kháng thể được mô tả ở đây có thể được biểu hiện trong động vật chuyển gen không phải là người.

Các dòng tế bào động vật có vú sẵn có là vật chủ để biểu hiện được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm nhiều dòng tế bào bất tử sẵn có từ Bảo tàng lưu giữ giống Mỹ (ATCC), bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào trứng của chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO), các tế bào NSO, các tế bào HeLa, các tế bào thận của chuột đồng nhỏ (baby hamster kidney-BHK), các tế bào thận của chuột (COS), các tế bào caxinoma tế bào gan của người (ví dụ, Hep G2), và một số dòng tế bào khác. Các tế bào không phải của động vật có vú, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, vi khuẩn, nấm men, côn trùng và thực vật có thể cũng được sử dụng để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp. Sự phát sinh đột biến trực tiếp điểm của miền CH2 của kháng thể để loại bỏ sự glycosyl hóa có thể được ưu tiên để ngăn ngừa sự thay đổi tính sinh miễn dịch, được động học, và/hoặc các chức năng hiệu ứng thu được từ sự glycosyl hóa không phải của người. Các phương pháp biểu hiện được chọn bằng cách xác định hệ thống tạo ra mức biểu hiện cao nhất và sản xuất kháng thể có các đặc điểm liên kết GCC cơ định.

Phương án khác nữa đề xuất phương pháp sản xuất phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ phân tử kháng thể của người hoặc làm cho giống như của người, bao gồm duy trì tế bào chủ chứa các axit nucleic được mô tả ở đây, ví dụ., một hoặc nhiều trình tự axit nucleic được liệt kê trong Bảng 4 hoặc 6, dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện globulin miễn dịch, nhờ đó các chuỗi globulin miễn dịch, được biểu hiện và phân tử kháng thể, ví dụ, phân tử kháng thể của người hoặc giống người liên kết với GCC, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó được sản xuất. Ví dụ, các phương pháp biểu hiện các phân tử kháng thể bao gồm sử dụng các tế bào chủ trong đó phân tử axit nucleic tái tổ hợp thứ nhất mã hóa phân tử kháng thể, ví dụ chuỗi nhẹ kháng thể của người hoặc làm giống như của người, và phân tử axit nucleic tái tổ hợp thứ hai mã hóa phân tử kháng thể, ví dụ, chuỗi nặng kháng thể của người hoặc làm giống như của người, được chứa trong một vector biểu hiện duy nhất. Theo các phương án khác, chúng ở trong các vector tách biệt. Phương pháp này có thể gồm thêm bước phân tách hoặc thu hồi kháng

thể, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể, chuỗi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chuỗi kháng thể, nếu muốn.

Ví dụ, phân tử axit nucleic (*nghĩa là*, một hoặc nhiều phân tử axit nucleic) mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể của người liên kết với protein GCC, hoặc cấu trúc biểu hiện (*nghĩa là*, một hoặc nhiều cấu trúc) chứa (các) phân tử axit nucleic này, có thể được đưa vào trong tế bào chủ thích hợp để tạo nên tế bào chủ tái tổ hợp sử dụng phương pháp bất kỳ thích hợp đối với tế bào chủ được chọn này (*ví dụ*, biến nạp, chuyển nhiễm, xung điện, lây nhiễm), sao cho (các) phân tử axit nucleic được liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều yếu tố điều khiển sự biểu hiện (*ví dụ*, trong vector, trong cấu trúc được tạo ra bằng các quy trình xử lý trong tế bào, được xen vào trong hệ gen tế bào chủ). Tế bào chủ tái tổ hợp thu được có thể được duy trì dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện (*ví dụ*, trong sự có mặt của chất cảm ứng, trong động vật không phải là người thích hợp, trong môi trường nuôi cấy thích hợp được bổ sung các muối thích hợp, các yếu tố sinh trưởng, các chất kháng sinh, các chất bổ sung dinh dưỡng, v.v.), nhờ đó tạo ra (các) polypeptit được mã hóa. Nếu muốn, protein được mã hóa có thể được phân tách hoặc thu hồi (*ví dụ*, từ động vật, tế bào chủ, môi trường, sữa). Quy trình này bao gồm sự biểu hiện trong tế bào vật chủ của động vật chuyển gen không phải là người (xem, *ví dụ*, WO 92/03918, GenPharm International) hoặc thực vật.

Hơn nữa, sự biểu hiện các kháng thể theo sáng chế (hoặc các gốc khác của nó) từ các dòng tế bào sản xuất có thể được tăng cường sử dụng một số kỹ thuật đã biết. Ví dụ, các hệ biểu hiện gen glutamin synthetaza và DHFR là các phương pháp thông thường để tăng cường biểu hiện dưới các điều kiện nhất định. Các dòng tế bào vô tính biểu hiện cao có thể được xác định sử dụng các kỹ thuật thông thường, như tách dòng vô tính pha loãng giới hạn, công nghệ Microdrop, hoặc các phương pháp khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hệ thống GS được thảo luận toàn bộ hoặc một phần liên quan đến Patent Châu Âu số 0 216 846, 0 256 055, và 0 323 997 và đơn yêu cầu cấp Patent Châu Âu số 89303964.4.

Trong các hệ điển hình để biểu hiện tái tổ hợp kháng thể được cải biến, hoặc phân gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa cả hai chuỗi nặng kháng thể và chuỗi nhẹ kháng thể được đưa vào trong các tế bào dhfr-CHO bằng cách chuyển nhiễm qua trung gian canxi phosphat. Trong vector biểu hiện tái tổ hợp, các gen chuỗi nặng và nhẹ kháng thể mỗi gen này được liên kết linh hoạt

với trình tự tăng cường/các yếu tố điều hòa trình tự khởi đầu (ví dụ, có nguồn gốc từ SV40, CMV, adenovirut và virut tương tự, như trình tự tăng cường CMV/yếu tố điều hòa trình tự khởi đầu AdMLP hoặc trình tự tăng cường SV40 /yếu tố điều hòa trình tự khởi đầu AdMLP) để điều khiển các mức phiên mã cao của các gen này. Các vector biểu hiện tái tổ hợp cũng mang gen DHFR, mà cho phép chọn lọc các tế bào CHO đã được chuyển nhiễm vector này sử dụng sự chọn lọc metotrexat /khuếch đại. Các tế bào chủ biến nạp chọn lọc được nuôi cấy để cho phép biểu hiện các chuỗi nặng và nhẹ kháng thể và các kháng thể nguyên vẹn được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn được sử dụng để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp, chuyển nhiễm các tế bào chuẩn, chọn lọc các thể biến nạp, nuôi cấy các tế bào chủ và thu hồi kháng thể từ môi trường nuôi cấy.

Các kháng thể theo sáng chế có thể cũng được sản xuất bằng cách chuyển gen thông qua việc tạo ra động vật hoặc thực vật chuyển gen các trình tự chuỗi nặng và nhẹ globulin miễn dịch quan tâm và sản xuất kháng thể ở dạng có thể thu hồi từ đó. Liên quan đến sản xuất chuyển gen ở động vật có vú, các kháng thể có thể được sản xuất trong, và được thu hồi từ, sữa dê, bò, hoặc các động vật có vú khác. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172, và 5.741.957.

Các kháng thể, các mảnh gắn kết kháng nguyên, các chuỗi kháng thể và các phần gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có thể cũng được sản xuất trong hệ thống biểu hiện *in vitro* thích hợp, bằng tổng hợp hóa học hoặc các phương pháp thích hợp khác bất kỳ.

Protein dung hợp và các thể liên hợp miễn dịch

Các kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây có thể được liên kết về mặt chức năng bằng phương pháp thích hợp bất kỳ (ví dụ, nối hóa học, dung hợp di truyền, liên kết không đồng hóa trị hoặc phương pháp khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử không phải kháng thể.

Các protein dung hợp có thể được tạo ra trong đó phân tử kháng thể kháng GCC như được mô tả ở đây và gốc không phải kháng thể là các thành phần của một chuỗi polypeptit liên tục. Gốc không phải kháng thể có thể được đặt ở đầu tận cùng N, đầu tận cùng C, hoặc bên trong gốc phân tử kháng thể. Ví dụ, một số phương án có thể có thể được sản xuất bằng cách xen axit nucleic mã hóa trình tự globulin miễn dịch

vào trong vector biểu hiện thích hợp, như vector pET (ví dụ, pET-15b, Novagen), vector thực khuẩn thể (ví dụ, pCNATAB 5 E, Pharmacia), hoặc vector khác, ví dụ, vector dung hợp Protein A pRIT2T, Pharmacia). Cấu trúc thu được có thể được biểu hiện để sản xuất chuỗi kháng thể chứa gốc không phải kháng thể (ví dụ, đuôi Histidin, đuôi E, hoặc vùng liên kết IgG Protein A). Các protein dung hợp có thể được phân tách hoặc được thu hồi sử dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, như sắc ký sử dụng chất nền ái lực thích hợp (xem, ví dụ, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M *et al.*, eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8 (1991))).

Sáng chế đề xuất các phân tử kháng thể kháng GCC mà hướng đến và theo các phương án được nội nhập vào trong các tế bào. Chúng có khả năng phân phối các dược chất hoặc các chất có thể phát hiện đến hoặc vào trong các tế bào biểu hiện GCC, nhưng không đến hoặc vào trong các tế bào trong đó đích này không được biểu hiện. Do đó, sáng chế cũng đề xuất các thể liên hợp miễn dịch kháng GCC gồm phân tử kháng thể kháng GCC như được mô tả ở đây, được tiếp hợp với dược chất hoặc chất có thể phát hiện. Theo các phương án, ái lực đối với GCC của thể liên hợp miễn dịch kháng GCC ít nhất là 10, 25, 50, 75, 80, 90, hoặc 95% ái lực so với kháng thể không được tiếp hợp. Điều này có thể được xác định sử dụng GCC bề mặt tế bào hoặc GCC phân tách. Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, thể liên hợp miễn dịch, có LD50, như được xác định bởi thử nghiệm được mô tả ở đây, nhỏ hơn 1.000, 500, 250, 100, hoặc 50 pM.

Phân tử kháng thể kháng GCC có thể được cải biến để đóng vai trò làm thể liên hợp miễn dịch sử dụng các kỹ thuật được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem ví dụ, Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993). Cũng xem Patent Mỹ số 5.194.594. Điều chế các kháng thể được đánh dấu phóng xạ có thể cũng được điều chế dễ dàng sử dụng các kỹ thuật được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem ví dụ, Junghans *et al.* in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Cũng xem Patent Mỹ số 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (U.S. Re. Pat. No. 35,500), 5.648.471, và 5.697.902.

Theo một số phương án, phân tử kháng thể và gốc không phải là kháng thể được nối với nhau bằng đoạn liên kết. Theo các phương án này, thể liên hợp miễn dịch có công thức (*I*):



Trong đó,

Ab là phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây;

X là gốc nối Ab và Z, ví dụ, gốc đoạn liên kết được mô tả ở đây sau khi liên kết đồng hóa trị với một hoặc cả hai Ab và Z;

Z là dược chất hoặc chất đánh dấu; và

m nằm trong khoảng từ 1 đến 15.

m thay đổi là số các gốc $-\text{X}-\text{Z}$ cho mỗi phân tử kháng thể trong thể liên hợp miễn dịch có công thức (I). Theo các phương án khác nhau, m nằm trong khoảng từ 1 đến 15, từ 1 đến 10, từ 1 đến 9, từ 1 đến 8, từ 1 đến 7, từ 1 đến 6, từ 1 đến 5, từ 1 đến 4, từ 1 đến 3, hoặc từ 1 đến 2. Theo một số phương án, m nằm trong khoảng từ 2 đến 10, từ 2 đến 9, từ 2 đến 8, từ 2 đến 7, từ 2 đến 6, từ 2 đến 5, từ 2 đến 4 hoặc từ 2 đến 3. Theo các phương án khác, m là 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6. Trong các chế phẩm chứa nhiều thể liên hợp miễn dịch có công thức (I), m là số gốc $-\text{X}-\text{Z}$ trung bình cho mỗi Ab, cũng được đề cập là lượng tải nạp dược chất trung bình. Lượng tải nạp dược chất trung bình có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 15 gốc $-\text{X}-\text{Z}$ cho mỗi Ab. Theo một số phương án, khi m là lượng tải nạp dược chất trung bình, m là khoảng 1, khoảng 2, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5, khoảng 6, khoảng 7, hoặc khoảng 8. Theo các phương án điển hình, m nằm trong khoảng từ 2 đến 8. Theo một phương án, m là khoảng 8. Theo phương án khác, m là khoảng 4. Theo phương án khác, m là khoảng 2.

Số các gốc $-\text{X}-\text{Z}$ trung bình cho mỗi Ab có thể được mô tả bằng các phương pháp thông thường như quang phổ khối, thử nghiệm ELISA, và HPLC. Sự phân bố định lượng các thể liên hợp miễn dịch dưới dạng m có thể cũng được xác định. Trong một số trường hợp, tách, tinh chế, và mô tả đặc điểm các thể liên hợp miễn dịch đồng nhất trong đó m là giá trị nhất định, như được phân biệt với các thể liên hợp miễn dịch có lượng tải nạp dược chất khác, có thể đạt được bằng phương pháp như HPLC pha ngược hoặc điện di.

Các thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) có thể tồn tại ở dạng các hỗn hợp, trong đó mỗi thành phần của hỗn hợp này có các giá trị m khác nhau. Ví dụ, thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) có thể tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm hai thành phần thể liên hợp miễn dịch tách biệt: một thành phần thể liên hợp miễn dịch trong đó m là 7, và thành phần thể liên hợp miễn dịch còn lại trong đó m là 8.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt, trong đó m cho ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt này tương ứng là 1, 2, và 3.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt, trong đó m cho ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt này tương ứng là 3, 4, và 5.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt, trong đó m cho ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt này tương ứng là 5, 6, và 7.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt, trong đó m cho ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt này tương ứng là 7, 8, và 9.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt, trong đó m cho ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt này tương ứng là 9, 10, và 11.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt, trong đó m cho ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt này tương ứng là 11, 12, và 13.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt, trong đó m cho ba thể liên hợp miễn dịch tách biệt này tương ứng là 13, 14, và 15.

Nhiều đoạn liên kết thích hợp khác nhau (ví dụ, các chất phản ứng hai chức năng khác nhau để nối phân tử kháng thể với dược chất hoặc chất đánh dấu) và các phương pháp điều chế các thể liên hợp miễn dịch được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Xem, ví dụ, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992).) Đoạn liên kết có thể

phân giải, ví dụ, dưới các điều kiện sinh lý, ví dụ, dưới các điều kiện nội bào, sao cho sự phân giải đoạn liên kết làm giải phóng được chất này (được chất hoặc chất đánh dấu) trong môi trường nội bào. Theo các phương án khác, đoạn liên kết không thể phân giải, và được chất được giải phóng, ví dụ, bằng cách thoái hóa kháng thể.

Đoạn liên kết có thể được liên kết với nhóm phản ứng hóa học trên gốc kháng thể, ví dụ, với nhóm amino, imino, hydroxyl, thiol hoặc carboxyl tự do (ví dụ, với đầu tận cùng N- hoặc C-, với nhóm amino epsilon của một hoặc nhiều gốc lysin, nhóm axit carboxylic tự do của một hoặc nhiều gốc axit glutamic hoặc aspartic, hoặc với nhóm sulfhydryl của một hoặc nhiều gốc cysteinyl). Vị trí mà đoạn liên kết được liên kết với có thể là gốc có trong tự nhiên trong trình tự axit amin của gốc kháng thể hoặc nó có thể được đưa vào trong gốc kháng thể, ví dụ, bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN (ví dụ, bằng cách đưa vị trí phân cắt cystein hoặc proteaza trong trình tự axit amin) hoặc bằng hóa sinh protein (ví dụ, khử, điều chỉnh pH hoặc phân giải protein).

Một trong số các phương pháp nối đồng hóa trị không đặc hiệu được sử dụng thông thường nhất là phản ứng carbodiimite để nối nhóm carboxy (hoặc amino) của hợp chất với các nhóm amino (hoặc carboxy) của phân tử kháng thể. Hơn nữa, các chất có hai chức năng như các dialdehyt hoặc imidoeste đã được sử dụng để nối nhóm amino của hợp chất với các nhóm amino của phân tử kháng thể. Cũng sẵn có để nối các được chất với các phân tử kháng thể là phản ứng bazơ Schiff. Phương pháp này bao gồm sự oxy hóa periodat của được chất chứa các nhóm glycol hoặc hydroxy, do đó tạo thành aldehyt mà sau đó cho phản ứng với phân tử kháng thể. Việc nối diễn ra thông qua sự tạo thành bazơ Schiff với các nhóm amino của phân tử kháng thể. Isothioxyanat có thể cũng được sử dụng làm các chất nối để nối đồng hóa trị các được chất với phân tử kháng thể. Các kỹ thuật khác được biết đến với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và trong phạm vi của sáng chế này.

Theo các phương án nhất định, chất trung gian là tiền chất của đoạn liên kết (X), phản ứng với được chất (Z) dưới các điều kiện thích hợp. Theo các phương án nhất định, các nhóm phản ứng được sử dụng trên được chất và/hoặc chất trung gian. Sản phẩm của phản ứng này giữa được chất và chất trung gian, hoặc được chất được tạo dẫn xuất, sau đó được cho phản ứng với phân tử kháng thể dưới các điều kiện thích hợp.

Các thể liên hợp miễn dịch có thể được tinh chế từ các chất phản ứng bằng cách sử dụng các phương pháp được biết nhiều đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ sắc ký cột (ví dụ, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, lọc gel, sắc ký tương tác kỵ nước), sự thẩm tách, siêu lọc hoặc kết tủa. Thể liên hợp miễn dịch có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp được biết nhiều đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, SDS-PAGE, quang phổ khối, hoặc điện di mao dẫn.

Theo một số phương án, đoạn liên kết có thể bị phân giải bằng chất phân giải có mặt trong môi trường nội bào (ví dụ, trong tiêu thể “lysosom” hoặc thể nội bào “endosom” hoặc hốc nhỏ “caveolea”). Đoạn liên kết có thể là ví dụ đoạn liên kết peptidyl mà được phân giải bởi enzym peptidaza hoặc proteaza nội bào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, proteaza của lysosom hoặc endosom. Theo một số phương án, đoạn liên kết peptidyl có chiều dài ít nhất là hai axit amin hoặc có chiều dài ít nhất là ba axit amin. Các chất phân giải có thể bao gồm cathepsin B và D và plasmin, tất cả chúng được biết là để thủy phân các dẫn xuất được chất dipeptit dẫn đến sự giải phóng được chất hoạt tính vào bên trong tế bào đích (xem, ví dụ, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Điển hình nhất là các đoạn liên kết peptidyl mà có thể phân giải bởi các enzym có mặt trong tế bào biểu hiện GCC. Ví dụ, đoạn liên kết peptidyl có thể phân giải bằng proteaza cathepsin-B phụ thuộc thiol, mà được biểu hiện nhiều trong các mô bị ung thư, có thể được sử dụng (ví dụ, đoạn liên kết Phe-Leu hoặc Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:319)). Các ví dụ khác về các đoạn liên kết này được mô tả ví dụ trong Patent Mỹ số 6.214.345, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó và cho tất cả các mục đích. Theo các phương án cụ thể, đoạn liên kết peptidyl có thể bị phân giải bằng proteaza nội bào là đoạn liên kết Val-Cit hoặc đoạn liên kết Phe-Lys (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6.214.345, mô tả việc tổng hợp doxorubixin có đoạn liên kết val-cit). Một hữu ích khác của việc sử dụng sự giải phóng thủy phân protein nội bào được chất đó là được chất thường bị giảm hoạt tính khi tiếp hợp và các ổn định trong huyết thanh của các thể liên hợp này thường là cao.

Theo các phương án khác, đoạn liên kết có thể phân giải là nhạy với pH, nghĩa là, nhạy với sự thủy phân ở các giá trị pH nhất định. Điển hình là, đoạn liên kết nhạy với pH có thể thủy phân dưới các điều kiện axit. Ví dụ, đoạn liên kết không bền với

axit có thể thủy phân trong lysosom (ví dụ, hydrazon, semicarbazon, thiosemicarbazon, cis-aconitic amit, orthoeste, axetal, ketal, hoặc chất tương tự) có thể được sử dụng. (Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.) Các đoạn liên kết này là tương đối ổn định dưới các điều kiện pH trung tính, như các điều kiện pH trong máu, nhưng không ổn định ở dưới pH 5,5 hoặc 5,0, pH xấp xỉ của lysosom. Theo các phương án nhất định, đoạn liên kết có thể thủy phân là đoạn liên kết thioete (như, ví dụ, thioete được gắn với dược chất thông qua liên kết axylhydrazon (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5.622.929).

Theo các phương án khác nữa, đoạn liên kết có thể phân giải dưới các điều kiện khử (ví dụ, đoạn liên kết disulfua). Nhiều đoạn liên kết disulfua được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm ví dụ, các đoạn liên kết disulfua có thể được tạo thành sử dụng SATA (N-succinimidyl-S-axetylthioaxetat), SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat), SPDB (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrat) và SMPT (N-succinimidyl-oxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)toluen, SPDB và SMPT (Xem, ví dụ, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Cũng xem Patent Mỹ số 4.880.935.)

Theo phương án cụ thể khác nữa, đoạn liên kết là đoạn liên kết malonat (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), đoạn liên kết maleimidobenzoyl (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg Med Chem.* 3(10):1299-1304), hoặc chất tương tự 3'-N-amit (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

Theo một phương án, đơn vị đoạn liên kết không phân giải được và dược chất được giải phóng do sự thoái hóa kháng thể. (Xem ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 20050238649 được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó và cho tất cả các mục đích).

Điển hình, đoạn liên kết hầu như không nhạy cảm với môi trường ngoại bào. Như được sử dụng ở đây, “hầu như không nhạy cảm với môi trường ngoại bào,” trong phạm vi đoạn liên kết, nghĩa là không nhiều hơn khoảng 20%, thường là không nhiều hơn khoảng 15%, điển hình hơn không nhiều hơn khoảng 10%, và cũng điển hình hơn không nhiều hơn khoảng 5%, không nhiều hơn khoảng 3%, hoặc không nhiều hơn

khoảng 1% đoạn liên kết, trong mẫu thể liên hợp miễn dịch, bị phân giải khi thể liên hợp miễn dịch có mặt trong môi trường ngoại bào (ví dụ, trong huyết tương). Liệu đoạn liên kết có hầu như không nhạy cảm với môi trường ngoại bào hay không có thể được xác định, ví dụ, bằng cách ủ thể liên hợp miễn dịch với huyết tương trong khoảng thời gian được xác định trước (ví dụ, 2, 4, 8, 16, hoặc 24 giờ) và sau đó định lượng lượng được chất tự do có trong huyết tương.

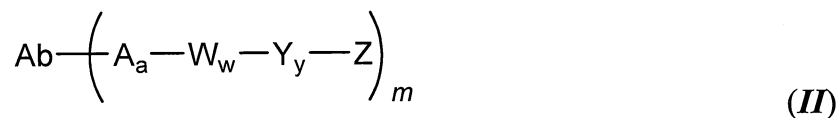
Theo các phương án duy nhất, không tương hỗ khác, đoạn liên kết thúc đẩy sự nội nhập tế bào. Theo các phương án nhất định, đoạn liên kết thúc đẩy sự nội nhập tế bào khi được tiếp hợp với chất chữa bệnh hoặc chất đánh dấu (Z). Theo các phương án khác nữa, đoạn liên kết thúc đẩy sự nội nhập tế bào khi được tiếp hợp với cả hai gốc Z và phân tử kháng thể kháng GCC.

Nhiều đoạn liên kết điển hình khác nhau mà có thể được sử dụng với các chế phẩm và phương pháp này được mô tả trong WO 2004-010957, công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 20060074008, công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 20050238649, và công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 20060024317 (mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó và cho tất cả các mục đích).

Ví dụ về các đoạn liên kết có thể được sử dụng để kết hợp phân tử kháng thể với tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu bao gồm, ví dụ, maleimitocaproyl (mc); maleimitocaproyl-*p*-aminbenzylcarbamate; đoạn nối maleimitocaproyl-peptit-aminbenzylcarbamate, ví dụ, maleimitocaproyl-L-phenylalanin-L-lysine-*p*-aminbenzylcarbamate và maleimitocaproyl-L-valine-L-xitruin-*p*-aminbenzylcarbamate (vc); N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (cũng được gọi là N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate hoặc SPP); 4-succinimidyl-oxycarbonyl-2-methyl-2-(2-pyridyldithio)-toluene (SMPT); N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP); N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butyrate (SPDB); 2-iminothiolan; S-axetylsuccinic anhydride; disulfide benzyl carbamate; carbonate; đoạn liên kết hydrazon; este N-(α -maleimidoacetoxyl) succinimide; N-[4-(*p*-Azidosalicylamido) butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (AMAS); este N-[β -maleimidopropoxy]succinimide (BMPS); este [N- ϵ -maleimitocaproyloxy]succinimide (EMCS); este N-[γ -maleimidobutyroxy]succinimide (GMBS); succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl] xyclohexan-1-carboxyl-[6-amidocaproate] (LC-SMCC); succinimidyl 6-(3-[2-

pyridyldithio]-propionamido)hexanoat (LC-SPDP); este *m*-maleimitobenzoyl-N-hydroxysuccinimit (MBS); *N*-succinimidyl[4-iodoaxetyl]aminobenzoat (SIAB); succinimidyl 4-[*N*-maleimitometyl]xyclohexan-1-carboxylat (SMCC); *N*-succinimidyl 3-[2-pyridyldithio]-propionamido (SPDP); este [N- ϵ -maleimitocaproyloxy]sulfosuccinimit (Sulfo-EMCS); este N-[γ -maleimitobutyryloxy]sulfosuccinimit (Sulfo-GMBS); 4-sulfosuccinimidyl-6-metyl- α -(2-pyridyldithio)toluamido]hexanoat (Sulfo-LC-SMPT); sulfosuccinimidyl 6-(3'-[2-pyridyldithio]-propionamido)hexanoat (Sulfo-LC-SPDP); este *m*-maleimitobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimit (Sulfo-MBS); *N*-sulfosuccinimidyl[4-iodoaxetyl]aminobenzoat (Sulfo-SIAB); sulfosuccinimidyl 4-[*N*-maleimitometyl]xyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC); sulfosuccinimidyl 4-[*p*-maleimitophenyl]butyrat (Sulfo-SMPB); etylen glycol-bis(este N-hydroxysuccinimit của axit succinic) (EGS); disuccinimidyl tartrat (DST); axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic (DOTA); axit dietylen-triamin-pentaaxetic (DTPA); và đoạn liên kết thiourea.

Theo một số phương án, đoạn liên kết -X- có công thức $-A_a-W_w-Y_y-$, và thể liên hợp miễn dịch có công thức (I) được đặc trưng bởi công thức (II):



trong đó,

Ab là phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây ;

-A- là đơn vị kéo dài (Stretcher unit);

a = 0 hoặc 1;

mỗi -W- độc lập là một đơn vị axit amin;

w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12;

-Y- là đơn vị đệm tự phân huỷ (self-immolative);

y = 0, 1, hoặc 2;

Z là tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu; và

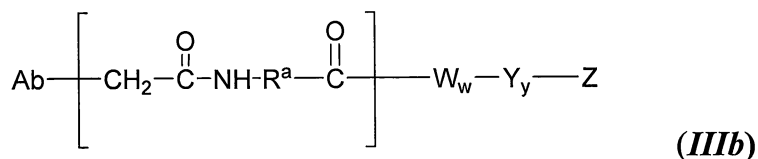
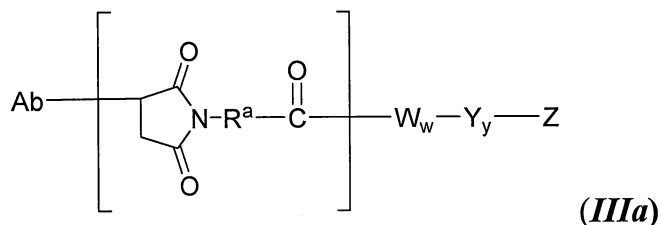
m nằm trong khoảng từ 1 đến 15.

Đơn vị kéo dài (A), khi có mặt, có khả năng gắn kết đơn vị Ab với đơn vị axit amin (-W-), nếu có mặt, với đơn vị đệm (-Y-), nếu có mặt; hoặc với tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu (Z). Các nhóm chức hữu dụng có thể nằm trên phân tử kháng thể kháng GCC, hoặc là tự nhiên hoặc qua các điều chế hoá học bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sulfhydryl, amino, hydroxyl, nhóm hydroxyl anome của hydrat cacbon, và carboxyl. Các nhóm chức thích hợp là sulfhydryl và amino. Trong một ví dụ, nhóm sulfhydryl có thể được tạo ra bằng cách khử liên kết disulfua nội phân tử của phân tử kháng thể kháng GCC. Theo phương án khác, các nhóm sulfhydryl có thể được tạo ra bằng cách phản ứng nhóm amino của gốc lysin của phân tử kháng thể kháng GCC bằng 2-iminothiolan (thuốc thử Traut) hoặc các thuốc thử để tạo ra sulfhydryl khác. Theo một số phương án, phân tử kháng thể kháng GCC là kháng thể tái tổ hợp và được thiết kế để mang một hoặc nhiều lysin. Theo một số phương án khác, phân tử kháng thể tái tổ hợp kháng GCC được thiết kế để mang các nhóm sulfhydryl khác, ví dụ, các cystein khác.

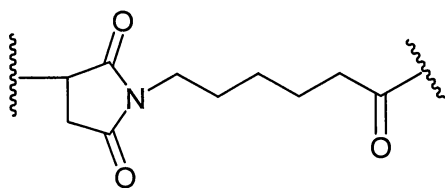
Theo một phương án, đơn vị kéo dài (Stretcher unit) tạo ra liên kết với nguyên tử lưu huỳnh của đơn vị Ab. Nguyên tử lưu huỳnh có thể có nguồn gốc từ nhóm sulfhydryl của Ab. Các đơn vị kéo dài (Stretcher unit) đặc trưng theo phương án này được thể hiện trong ngoặc vuông có công thức (*IIIa*) và (*IIIb*), trong đó Ab-, -W-, -Y-, -Z, w và y được xác định như trên, và R^a được chọn từ -C₁-C₁₀ alkyl-, -C₂-C₁₀ alkenyl-, -C₂-C₁₀ alkynyl-, -carbocyclo-, -O-(C₁-C₈ alkyl-), O-(C₂-C₈ alkenyl-), -O-(C₂-C₈ alkynyl-), -arylen-, -C₁-C₁₀ alkyl-arylen-, -C₂-C₁₀ alkenyl-arylen-, -C₂-C₁₀ alkynyl-arylen-, -arylen-C₁-C₁₀ alkyl-, -arylen-C₂-C₁₀ alkenyl-, -arylen-C₂-C₁₀ alkynyl-, -C₁-C₁₀ alkyl-(carbocyclo-), -C₂-C₁₀ alkenyl-(carbocyclo-), -C₂-C₁₀ alkynyl-(carbocyclo-), -(carbocyclo)-C₁-C₁₀ alkyl-, -(carbocyclo)-C₂-C₁₀ alkenyl-, -(carbocyclo)-C₂-C₁₀ alkynyl-, heterocyclo-, -C₁-C₁₀ alkyl-(heterocyclo-), -C₂-C₁₀ alkenyl-(heterocyclo-), -C₂-C₁₀ alkynyl-(heterocyclo-), -(heterocyclo)-C₁-C₁₀ alkyl-, -(heterocyclo)-C₂-C₁₀ alkenyl-, -(heterocyclo)-C₂-C₁₀ alkynyl-, -(CH₂CH₂O)_r-, hoặc -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, và r là số nguyên nằm trong khoảng từ 1-10, trong đó các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkyl-, alkenyl-, alkynyl-, aryl, carbocyl, carbocyclo, heterocyclo, và arylen này, một mình hoặc là một phần của nhóm khác, tùy ý được thể. Theo một số phương án, các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkyl-, alkenyl-, alkynyl-, aryl, carbocyl,

carbocyclo, heteroxyclo, và arylen này, một mình hoặc là một phần của nhóm khác, không được thể. Theo một số phương án, R^a được chọn từ $-C_1-C_{10}$ alkylen-, -carbocyclo-, $-O-(C_1-C_8 \text{ alkylen})-$, -arylen-, $-C_1-C_{10}$ alkylen-arylen-, -arylen- C_1-C_{10} alkylen-, $-C_1-C_{10}$ alkylen-(carbocyclo)-, -(carbocyclo)- C_1-C_{10} alkylen-, $-C_3-C_8$ heteroxyclo-, $-C_1-C_{10}$ alkylen-(heteroxyclo)-, -(heteroxyclo)- C_1-C_{10} alkylen-, $-(CH_2CH_2O)_r-$, và $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; và r là số nguyên nằm trong khoảng từ 1-10, trong đó các nhóm alkylen như vậy không được thể và các nhóm còn lại trong nhóm tùy ý được thể.

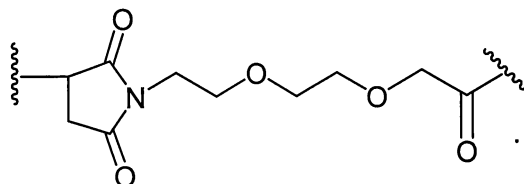
Hiểu rằng từ tất cả các phương án ví dụ rằng dù không được chỉ rõ, từ 1 đến 15 gốc được chất có thể được nối với Ab ($m = 1-15$).



Đơn vị kéo dài minh hoạ có công thức (IIIa) trong đó R^a là $-(CH_2)_5-$:

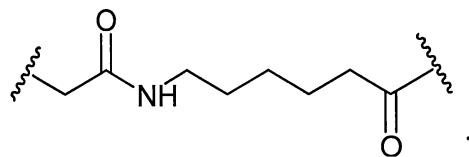


Đơn vị kéo dài minh hoạ khác có công thức (IIIa) trong đó R^a là $-(CH_2CH_2O)_r-$ CH_2- ; và $r = 2$:

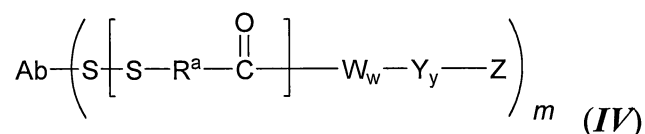


Đơn vị kéo dài minh hoạ khác có công thức (IIIa) trong đó R^a là -arylen- hoặc arylen- C_1-C_{10} alkylen-. Theo một số phương án, nhóm aryl là nhóm phenyl không được thể.

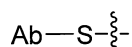
Một đơn vị kéo dài minh hoạ khác nữa là có công thức (*IIIb*) trong đó R^a là - (CH₂)₅-:



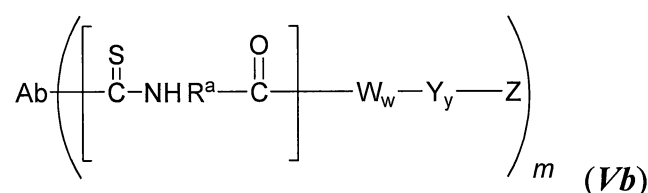
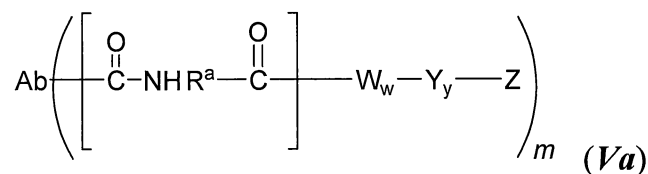
Theo một số phương án, đơn vị kéo dài được gắn kết với đơn vị Ab qua một liên kết disulfua giữa nguyên tử lưu huỳnh của đơn vị Ab và nguyên tử lưu huỳnh của đơn vị kéo dài. Đơn vị kéo dài đặc trưng theo phương án này được thể hiện trong ngoặc vuông có công thức (*IV*), trong đó R^a, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w và y được xác định như trên.



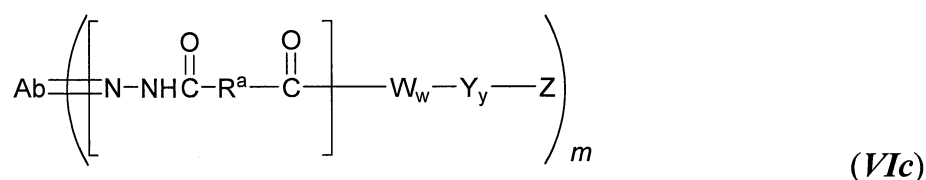
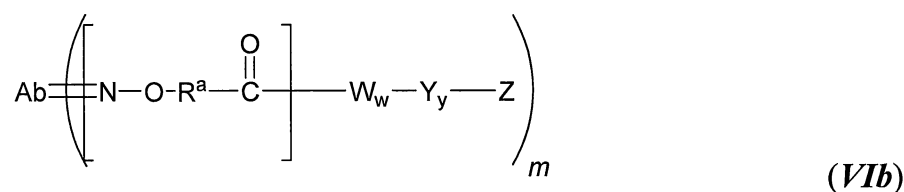
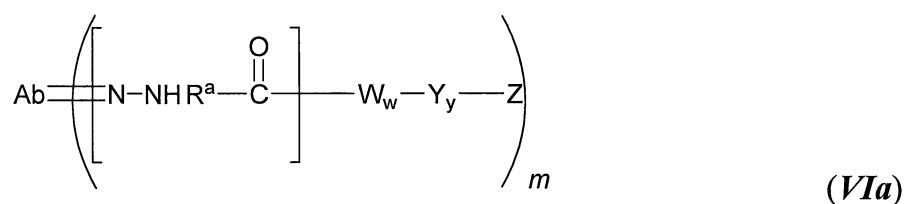
Lưu ý rằng trong suốt bản mô tả, gốc S trong công thức sau để chỉ nguyên tử lưu huỳnh của đơn vị Ab, trừ khi không có ghi chú nào khác.



Theo các phương án khác nữa, đơn vị kéo dài, trước khi được gắn với Ab, chứa một vị trí phản ứng sao cho có thể gắn kết với nhóm amin bậc 1 hoặc bậc 2 của Ab. Ví dụ về các vị trí phản ứng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, este hoạt động như este succinimit, este 4 nitrophenyl, este pentaflorophenyl, este tetraflorophenyl, anhydrit, axit clorua, sulfonyl clorua, isoxyanat và isothioxyanat. Các đơn vị kéo dài đặc trưng theo phương án này được thể hiện trong ngoặc vuông có công thức (*Va*) và (*Vb*), trong đó -R^a-, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w và y được xác định như trên;

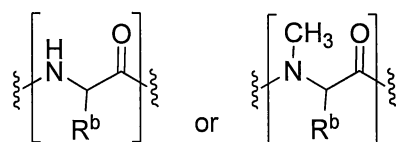


Theo một số phương án, đơn vị kéo dài chứa vị trí phản ứng mà sẽ phản ứng với nhóm (-CHO) của hydrat cacbon được biến đổi có thể có trong Ab. Ví dụ, hydrat cacbon có thể được oxy hoá nhẹ bằng thuốc thử như natri periodat và đơn vị (-CHO) thu được của hydrat cacbon oxy hoá có thể được ngưng tụ với một đơn vị kéo dài (Stretcher) chứa nhóm chức như hydrazit, oxim, amin bậc 1 hoặc bậc 2, hydrazin, thiosemicarbazon, hydrazin carboxylat, và arylhydrazit như các chất được mô tả bởi Kaneko *et al.*, 1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41. Các đơn vị kéo dài đặc trưng theo phương án này được thể hiện trong ngoặc vuông có công thức (VIa), (VIb), và (VIc), trong đó $-R^a$, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w và y như được xác định trên.

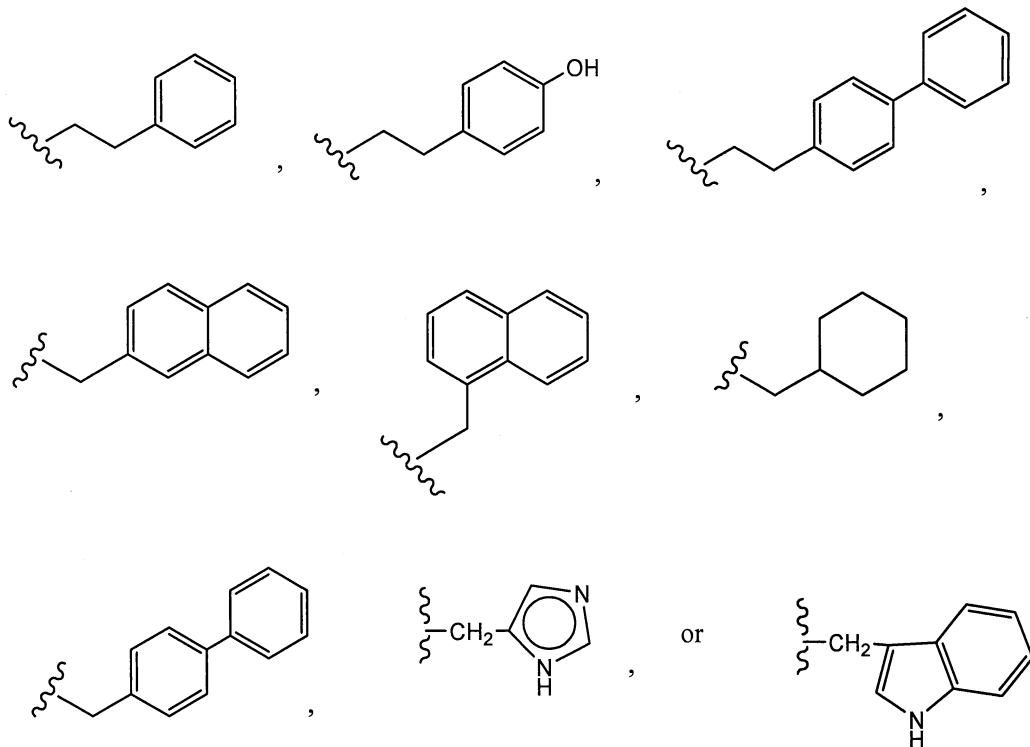


Đơn vị axit amin (-W-), khi có mặt, gắn kết đơn vị kéo dài (Stretcher unit) với đơn vị đệm (Spacer unit) nếu đơn vị đệm có mặt, gắn kết đơn vị kéo dài với gốc được chất nếu đơn vị đệm không có mặt, và gắn kết đơn vị Ab với tác nhân điều trị hoặc gốc đánh dấu nếu đơn vị kéo dài và đơn vị đệm không có mặt.

W_w - có thể là, ví dụ, đơn vị mono-peptit, di-peptit, tri-peptit, tetra-peptit, penta-peptit, hexa-peptit, hepta-peptit, octa-peptit, nona-peptit, deca-peptit, undeca-peptit hoặc dodeca-peptit. Mỗi đơn vị -W- độc lập có công thức được minh hoạ dưới đây trong ngoặc vuông, và w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12:

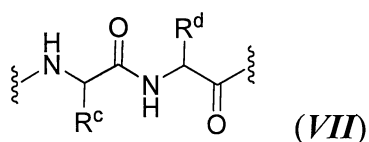


trong đó R^b là hydro, methyl, isopropyl, isobutyl, *sec*-butyl, benzyl, *p*-hydroxybenzyl, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, phenyl, xyclohexyl,

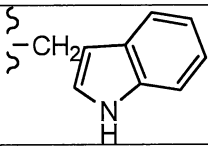


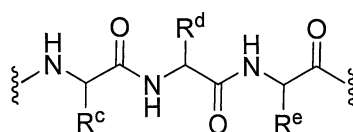
Theo một số phương án, đơn vị axit amin có thể được tách bằng enzym bằng một hoặc nhiều enzym, bao gồm proteaza liên quan đến ung thư hoặc khối u, để giải phóng tác nhân điều trị hoặc gốc đánh dấu (-Z), là những chất mà theo một phương án được proton hoá *in vivo* khi giải phóng để tạo thành tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu (Z).

Theo một số phương án, đơn vị axit amin có thể bao gồm các axit amin trong tự nhiên. Theo các phương án khác, đơn vị axit amin có thể bao gồm các axit amin không có trong tự nhiên. Các đơn vị W_w được thể hiện bởi công thức (VII)-(IX):



trong đó R^c và R^d như sau:

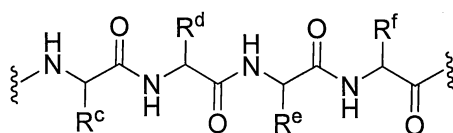
<u>R^c</u>	<u>R^d</u>
Benzyl	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
metyl	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
isopropyl	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
isopropyl	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
benzyl	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
isobutyl	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
<i>sec</i> -butyl	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
benzyl	metyl;
benzyl	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂ ;



(VIII)

trong đó R^c, R^d và R^e là như sau:

<u>R^c</u>	<u>R^d</u>	<u>R^e</u>
benzyl	Benzyl	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
isopropyl	Benzyl	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
		và
H	Benzyl	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;



(IX)

trong đó R^c, R^d, R^e và R^f là như sau:

<u>R^c</u>	<u>R^d</u>	<u>R^e</u>	<u>R^f</u>
H	benzyl	isobutyl	H; and
metyl	isobutyl	metyl	isobutyl.

Các đơn vị axit amin ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đơn vị có công thức (VII) trong đó: R^c là benzyl và R^d là $-(CH_2)_4NH_2$; R^c là isopropyl và R^d là $-(CH_2)_4NH_2$; hoặc R^c là isopropyl và R^d là $-(CH_2)_3NHCONH_2$. Các đơn vị axit amin ví dụ khác là đơn vị có công thức (VIII), trong đó R^c là benzyl, R^d là benzyl, và R^e là $-(CH_2)_4NH_2$.

Các đơn vị $-W_w-$ hữu dụng có thể được thiết kế và tối ưu hoá về tính chọn lọc của chúng để phân tách bằng enzym bằng một enzym cụ thể, ví dụ, proteaza liên quan đến khối u. Theo một phương án, đơn vị $-W_w-$ là đơn vị mà sự phân tách nó được xúc tác bằng cathepsin B, C và D, hoặc proteaza plasmin.

Theo một phương án, $-W_w-$ là dipeptit, tripeptit, tetrapeptit hoặc pentapeptit. Khi R^b , R^c , R^d , R^e hoặc R^f không phải là hydro, nguyên tử cacbon mà R^b , R^c , R^d , R^e hoặc R^f được gắn vào là bất đối xứng.

Mỗi nguyên tử cacbon mà R^b , R^c , R^d , R^e hoặc R^f được gắn vào là độc lập trong cấu hình (S) hoặc (R).

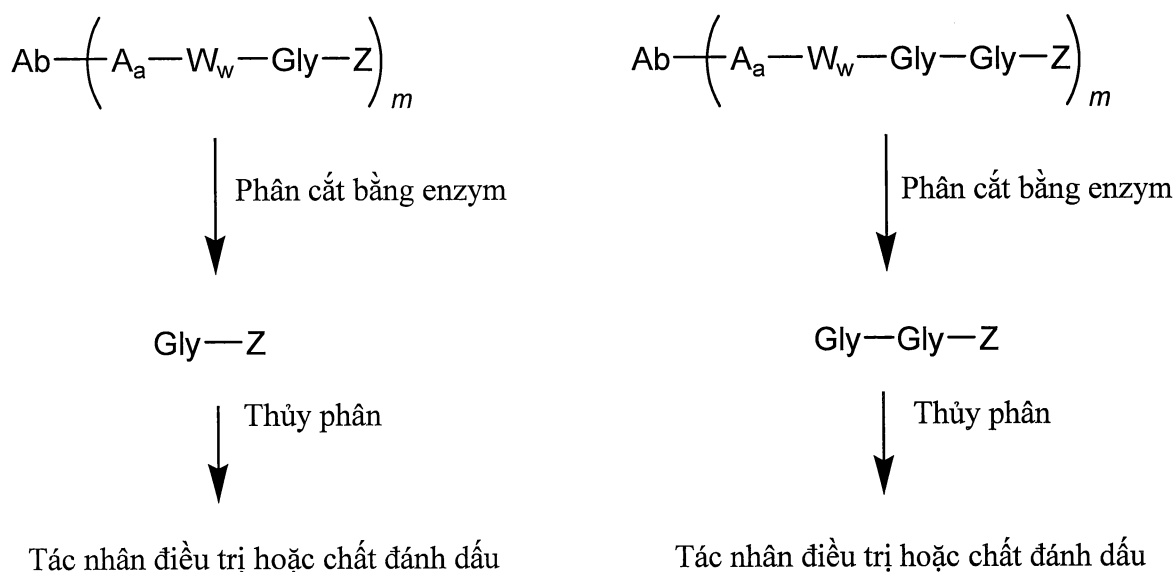
Theo một khía cạnh về đơn vị axit amin, đơn vị axit amin này là valin-xitruilin (vc hoặc val-cit). Theo khía cạnh khác, đơn vị axit amin này là phenylalanin-lysin (tức là, fk). Theo một khía cạnh khác nữa về đơn vị axit amin, đơn vị axit amin này là N-metylvalin-xitruilin. Theo khía cạnh khác nữa, đơn vị axit amin là axit 5-aminvaleric, homo phenylalanin lysin, tetraisoquinolinecarboxylat lysin, xyclohexylalanin lysin, isonepecotic axit lysin, beta-alanin lysin, glyxin serin valin glutamin và axit isonepecotic.

Đơn vị đệm ($-Y-$), khi có mặt, sẽ liên kết đơn vị axit amin với tác nhân điều trị hoặc gốc đánh dấu ($-Z-$) khi có mặt đơn vị axit. Theo cách khác, đơn vị đệm liên kết đơn vị kéo dài với tác nhân điều trị hoặc gốc đánh dấu khi không có đơn vị axit amin. Đơn vị đệm cũng liên kết tác nhân điều trị hoặc gốc đánh dấu với đơn vị Ab khi cả đơn vị axit amin và đơn vị kéo dài không có mặt.

Các đơn vị đệm có hai kiểu cơ bản: không tự phân huỷ hoặc tự phân huỷ. Đơn vị đệm không tự phân huỷ là đơn vị trong đó một phần hoặc toàn bộ các đơn vị đệm vẫn giữ liên kết với tác nhân điều trị hoặc gốc đánh dấu sau khi phân tách, cụ thể là bằng enzym, đơn vị axit amin từ thể liên hợp kháng thể-dược chất. Các ví dụ về đơn vị đệm không tự phân huỷ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đơn vị đệm (glyxin-

glyxin) và đơn vị đệm glyxin (cả hai được minh hoạ trong Sơ đồ 1) (sau đây). Khi thể liên hợp chứa đơn vị đệm glyxin-glyxin hoặc đơn vị đệm glyxin trải qua sự phân tách bằng enzym thông qua một enzym (ví dụ, proteaza liên quan đến tế bào khối u, proteaza liên quan đến tế bào ung thư hoặc liên quan đến lympho bào), gốc glyxin-glyxin-Z hoặc gốc glyxin-Z được phân tách khỏi Ab-Aa-Ww-. Theo một phương án, phản ứng thủy phân độc lập sẽ diễn ra trong tế bào đích, phân tách liên kết glyxin-gốc Z và giải phóng tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu.

Sơ đồ 1



Theo một số phương án, đơn vị đệm không tự phân huỷ (-Y-) là -Gly-. Theo một số phương án, đơn vị đệm không tự phân huỷ (-Y-) là -Gly-Gly-.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch có công thức (II) trong đó đơn vị đệm là không có mặt ($y = 0$), hoặc muối được dụng của nó.

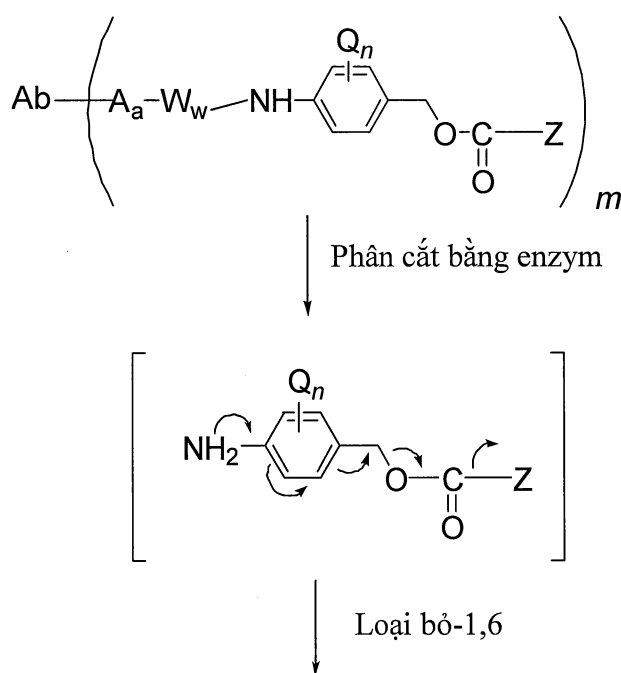
Theo cách khác, thể liên hợp chứa đơn vị đệm tự phân huỷ có thể giải phóng -Z-. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng cách tự phân huỷ” để chỉ gốc hoá học hai nhóm chức có thể liên kết đồng hoá trị cùng với hai gốc hoá học có khoảng cách vào trong một phân tử 3 thành phần ổn định. Nó sẽ tự động tách riêng khỏi gốc hoá học thứ hai nếu liên kết với gốc đầu tiên bị phân tách.

Theo một số phương án, -Y_y- là đơn vị rượu p-aminbenzylic (PAB) (xem Sơ đồ 2 và 3) mà phần phenylen của nó được thế bằng Q_n trong đó Q là -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -halogen, -nitro hoặc -xyano; và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-4. Các nhóm

alkyl, alkenyl và alkynyl, hoặc một mình hoặc là một phần của nhóm khác, có thể được tùy ý được thế.

Theo một số phương án, -Y- là nhóm PAB được gắn kết với -W_w thông qua nguyên tử nitơ của amin của nhóm PAB, và được nối trực tiếp với -Z thông qua nhóm carbonat, carbamat hoặc ete. Không bị giới hạn bởi lý thuyết hoặc cơ chế bất kỳ, **Sơ đồ 2** mô tả cơ chế có thể để giải phóng tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu (-Z) từ nhóm PAB gắn trực tiếp với -Z thông qua nhóm carbamat hoặc carbonat như được mô tả bởi Toki *et al.*, 2002, *J. Org. Chem.* 67:1866-1872.

Sơ đồ 2

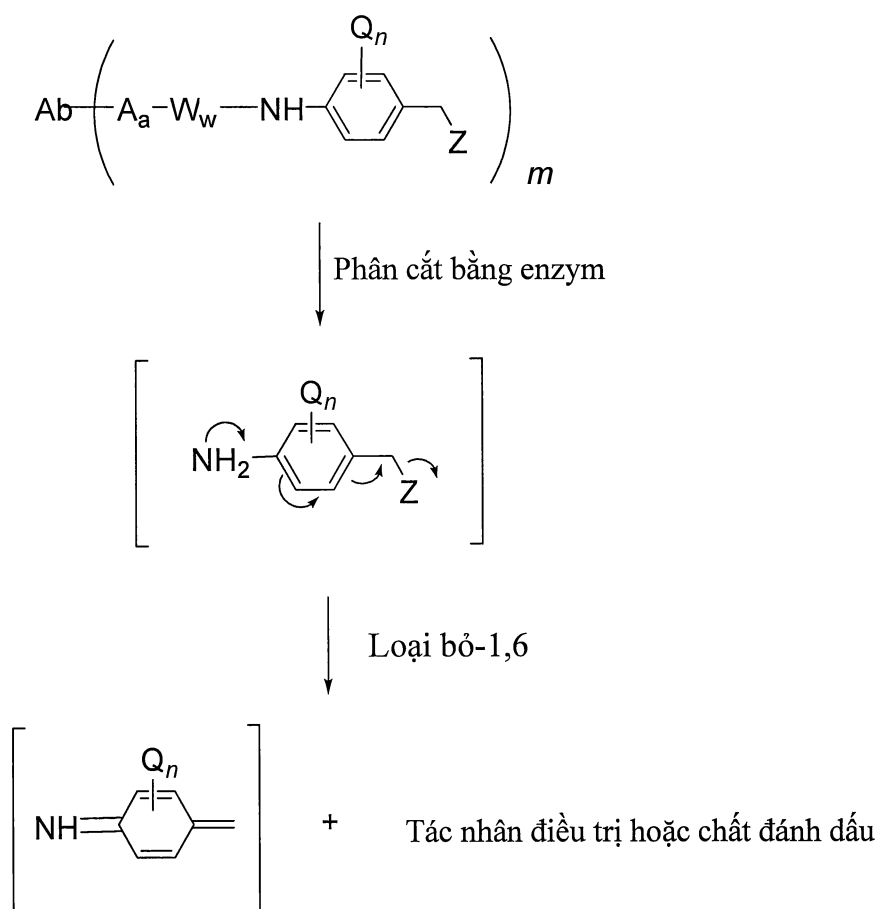


Tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu

Trong **Sơ đồ 2**, Q là -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -halogen, -nitro hoặc -xyano; m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-4; và m nằm trong khoảng từ 1 đến 20. Các nhóm alkyl, alkenyl và alkynyl, hoặc một mình hoặc là một phần của nhóm khác, có thể tùy ý được thế.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết hoặc cơ chế bất kỳ, **Sơ đồ 3** mô tả cơ chế có thể để giải phóng tác nhân điều trị hoặc gốc đánh dấu (-Z) từ nhóm PAB gắn trực tiếp với -Z thông qua liên kết ete hoặc amin, trong đó -Z bao gồm nhóm oxy hoặc nitơ là một phần của tác nhân điều trị hoặc gốc đánh dấu.

Sơ đồ 3



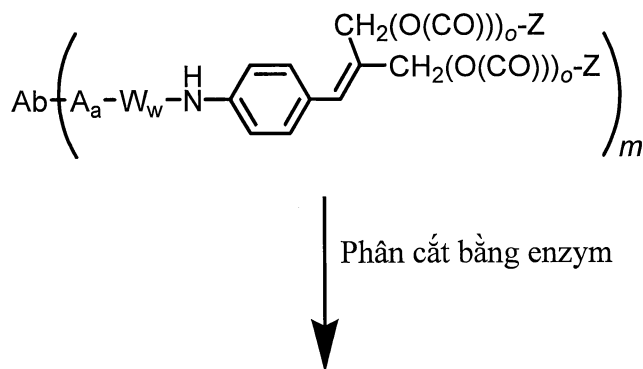
Trong Sơ đồ 3, Q là -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -halogen, -nitro hoặc -xyano; *n* là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-4; và *m* nằm trong khoảng từ 1 đến 20. Các nhóm alkyl, alkenyl và alkynyl, hoặc đơn độc hoặc nằm trong nhóm khác, có thể được tùy ý được thế.

Ví dụ khác về các gốc khoảng cách tự phân huỷ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất thơm tương tự về mặt điện tích với nhóm PAB như dẫn xuất 2-aminimidazol-5-metanol (Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) và ortho hoặc para-aminbenzylaxetal. Các gốc khoảng cách có thể được sử dụng sẽ trải qua sự đóng vòng khi thủy phân liên kết amit, như các amit của axit 4-aminobutyric được thế và không được thế (Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), các hệ nhân bixyclo[2.2.1] và bixyclo[2.2.2] được thế thích hợp (Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) và các amit của axit 2-aminophenylpropionic (Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867). Sự loại các dược chất chứa amin được thế ở vị trí α của

glyxin (Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) cũng là các ví dụ về các gốc khoảng cách tự phân hủy.

Theo một phương án, đơn vị đệm là đơn vị bis(hydroxymetyl)-styren (BHMS) phân nhánh như được mô tả trong Sơ đồ 4, có thể được sử dụng để kết hợp và giải phóng nhiều dược chất.

Sơ đồ 4

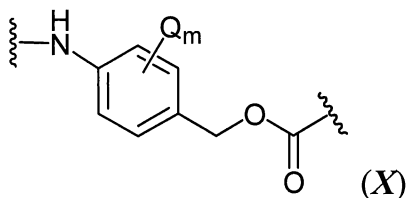


(2 x m) Tác nhân điều trị và chất đánh dấu

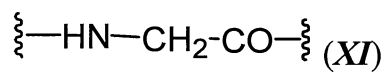
Trong Sơ đồ 4, Q là -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -halogen, -nitro hoặc -xyano; *n* là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-4; *o* = 0 hoặc 1; và *m* là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20. Các nhóm alkyl, alkenyl và alkynyl, hoặc một mình hoặc là một phần của nhóm khác, có thể được tùy ý được thế.

Theo một số phương án, gốc -Z là giống nhau. Theo phương án khác nữa, các gốc -Z là khác nhau.

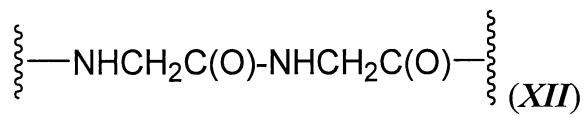
Theo một khía cạnh, các đơn vị đệm (-Y_y-) được thể hiện là công thức (X)-(XII):



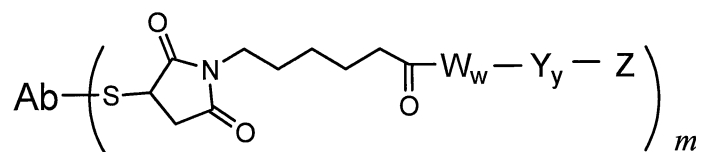
trong đó Q là -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), -O-(C₂-C₈ alkenyl), -O-(C₂-C₈ alkynyl), -halogen, -nitro hoặc -xyano; và *m* là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-4. Các nhóm alkyl, alkenyl và alkynyl, hoặc một mình hoặc là một phần của nhóm khác, có thể tùy ý được thế.



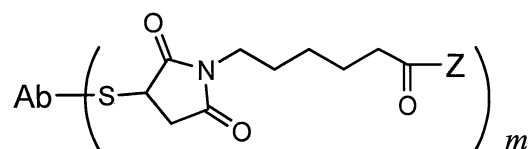
và



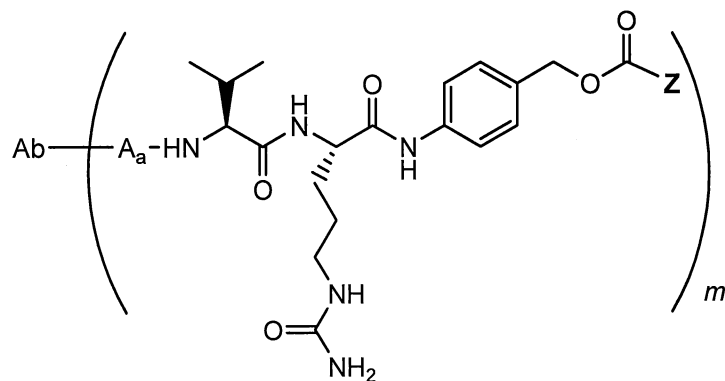
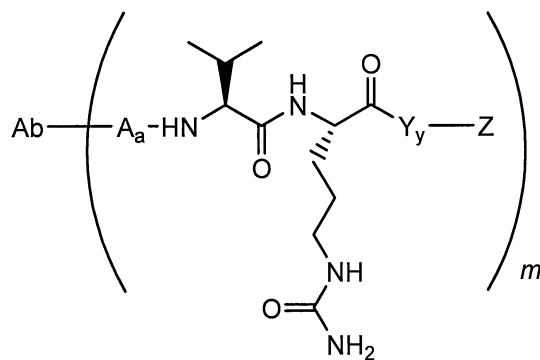
Trong nhóm các phương án được chọn, các thể liên hợp có công thức (I) và (II) là:

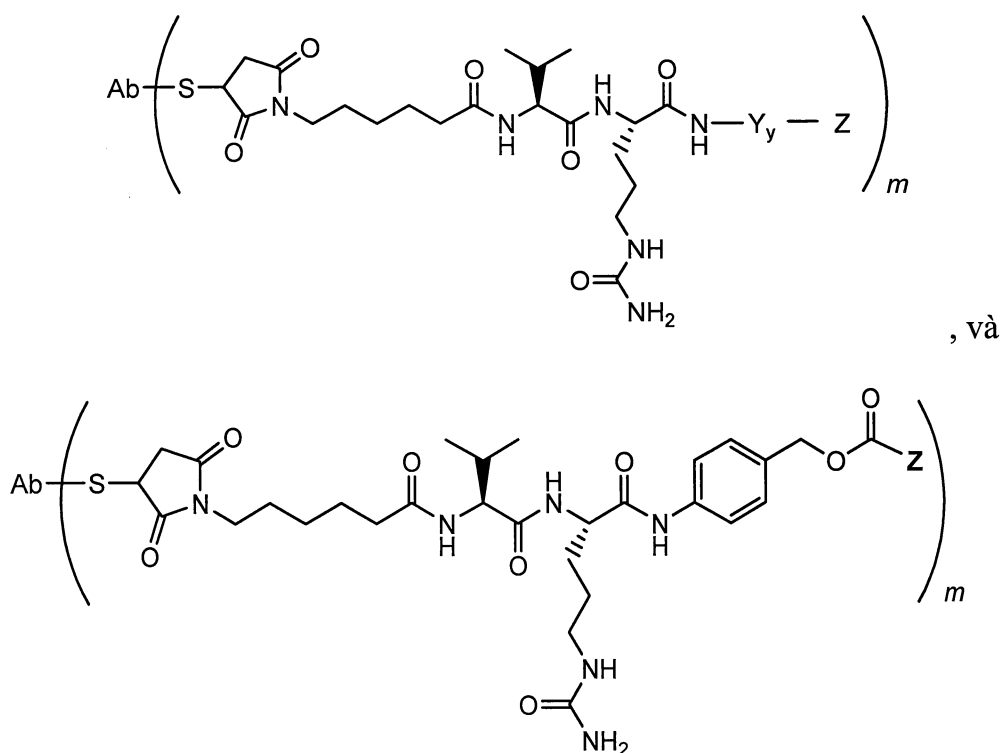


trong đó mỗi w và y = 0, 1 hoặc 2:



trong đó mỗi w và y = 0;





trong đó A_a , W_w , Y_y , Z và Ab có nghĩa nêu trên.

Z biến đổi trong công thức (I) là tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu. Tác nhân điều trị có thể là tác nhân bất kỳ có khả năng biểu hiện hiệu quả sinh học mong muốn. Theo một số phương án, tác nhân điều trị khiến tế bào nhạy cảm với phương thức điều trị thứ hai, ví dụ, tác nhân hoá trị liệu, liệu pháp xạ trị, liệu pháp miễn dịch.

Theo một số phương án, tác nhân điều trị là tác nhân kìm tế bào hoặc gây độc tế bào. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất kháng chuyển hoá (ví dụ, azathioprin, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, fludarabin, pentostatin, cladribin, 5-flouraxil (5FU), floxuridin (FUDR), cytosin arabinosit (xytarabin), metotrexat, trimethoprim, pyrimetamin, pemetrex hoá); tác nhân alkyl hoá (ví dụ, xyclophosphamit, mechlorethamin, uramustin, melphalan, chlorambucil, thiotepa/clorambucil, ifosfamid, carmustin, lomustin, streptozocin, busulfan, dibromomannitol, cisplatin, carboplatin, nedaplatin, oxaliplatin, satraplatin, triplatin tetranitrat, procarbazin, altretamin, dacarbazin, mitozolomit, temozolomit); anthracyclin (ví dụ, daunorubixin, doxorubixin, epirubixin, idarubixin, valrubixin); kháng sinh (ví dụ, dactinomycin, bleomycin, mithramycin, anthramycin, streptozotoxin, gramixidin D, mitomycin (ví dụ, mitomycin C), duocarmycin (ví dụ, CC-1065), calicheamixin); tác nhân chống gián phân (bao gồm, ví dụ, maytansinoit,

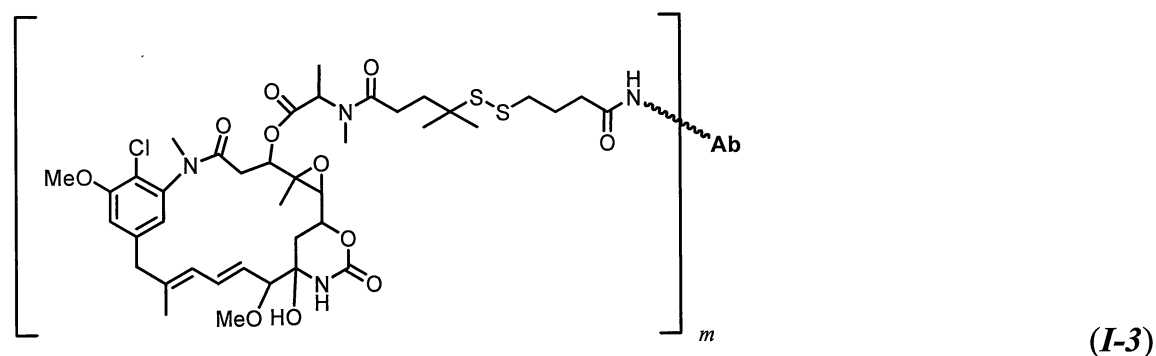
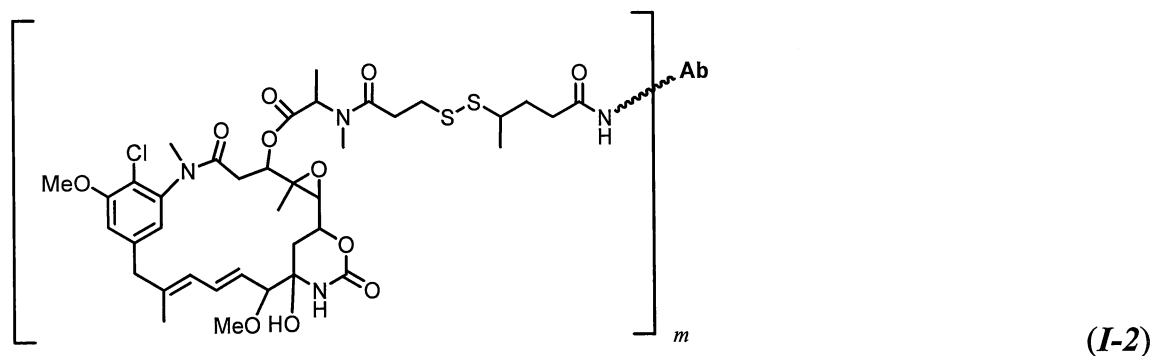
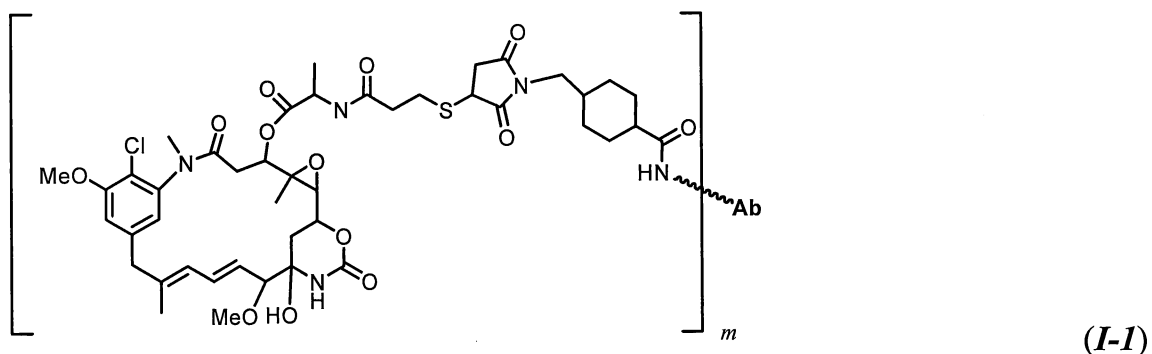
các auristatin, dolastatin, cryptophycin, alkaloid dừa cạn (ví dụ, vincristin, vinblastin, vindesin, vinorelbin), taxan (ví dụ, paclitaxel, docetaxel, hoặc taxan mới (xem, ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp Patent quốc tế số WO 01/38318, công bố ngày 31.05.2001)), và colchixin; chất ức chế topoisomeraza (ví dụ, irinotecan, topotecan, amsacrin, etoposide, teniposit, mitoxantron); và chất ức chế proteasom (ví dụ, axit peptidyl boronic).

Thế liên hợp miễn dịch maytansinoit

Theo một số phương án, tác nhân điều trị là maytansinoit. Các hợp chất maytansinoit và phương pháp để liên hợp chúng với các kháng thể được mô tả, ví dụ, trong Chari et al., *Cancer Res.*, 52: 127-131 (1992); Widdison et al., *J. Med. Chem.* 49: 4392-4408 (2006); và Patent Mỹ số 5.208.020 và 6.333.410. Ví dụ về các maytansinoit bao gồm các chất tương tự maytansin có nhân thơm cải biến (ví dụ, C-19-declo, C-20-demetoxy, C-20-acyloxy) và các chất được biến đổi ở các vị trí khác (ví dụ, C-9-CH, C-14-alkoxymethyl, C-14-hydroxymethyl hoặc acyloxymethyl, C-15-hydroxy/axyloxy, C-15-metoxy, C-18-N-demethyl, 4,5-deoxy). Theo một số phương án, maytansinoit là N^{2'}-deaxetyl-N^{2'}-(4-mercapto-1-oxopentyl)maytansin (DM3), N^{2'}-deaxetyl-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin (DM1), hoặc N^{2'}-deaxetyl-N^{2'}-(4-mercapto-4-methyl-1-oxopentyl)maytansin (DM4).

Các hợp chất maytansinoit bao gồm nhóm sulfhydryl có thể được kết hợp với các kháng thể sử dụng liên kết hai nhóm chức khác loại được nối với hợp chất maytansinoit theo cách liên kết thioete hoặc disulfit. Theo một số phương án như vậy, đoạn liên kết được kết hợp với nhóm amin trên kháng thể (ví dụ, nhóm amin tận cùng hoặc nhóm amino epsilon của gốc lysin. Theo một số phương án, liên kết hai nhóm chức khác loại được sử dụng để kết hợp hợp chất maytansinoit với kháng thể là N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat (cũng được gọi là N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoat, hoặc SPP), 4-succinimidyl-oxycarbonyl-2-methyl-2-(2-pyridyldithio)-toluen (SMPT), N-succinimidyl 4-[N-maleimitometyl]xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP); N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butyrat (SPDB), 2-iminothiolan, hoặc S-axetylsuccinic anhydrit.

Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (*I*) đặc trưng có công thức Ab-(SMCC-DM1)_{*m*} (công thức (*I-1*); Ab-(SPP-DM1)_{*m*} (công thức (*I-2*); hoặc Ab-(SPDB-DM4)_{*m*} (công thức (*I-3*), trong đó Ab là phân tử kháng thể kháng GCC như mô tả ở đây, và *m* có các giá trị và các giá trị ưu tiên mô tả trên đối với công thức (*I*).



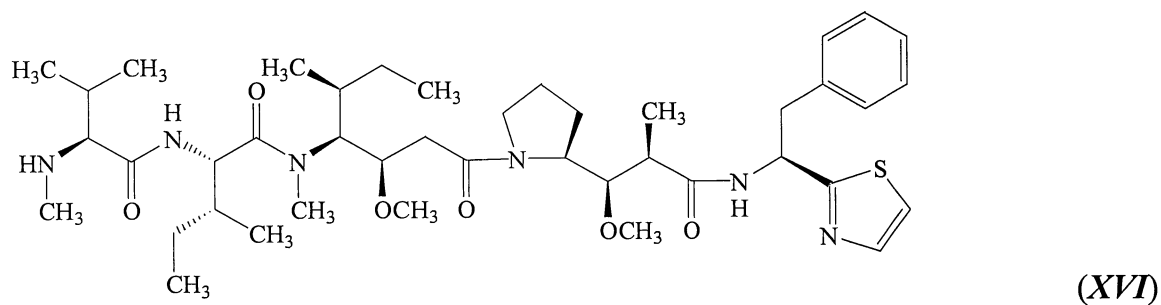
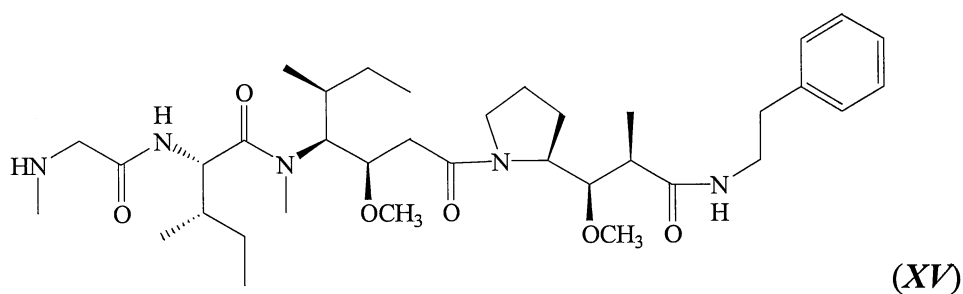
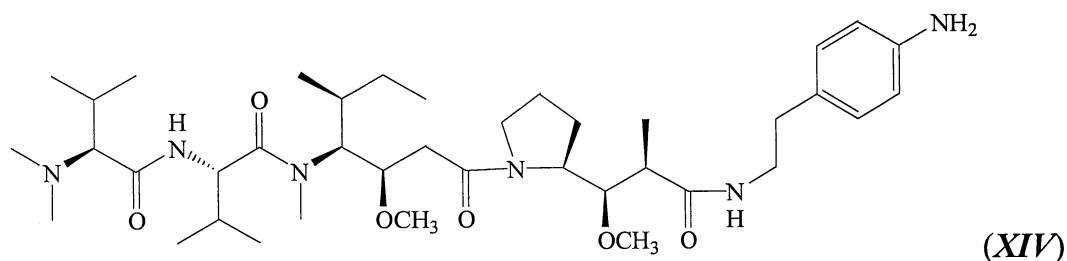
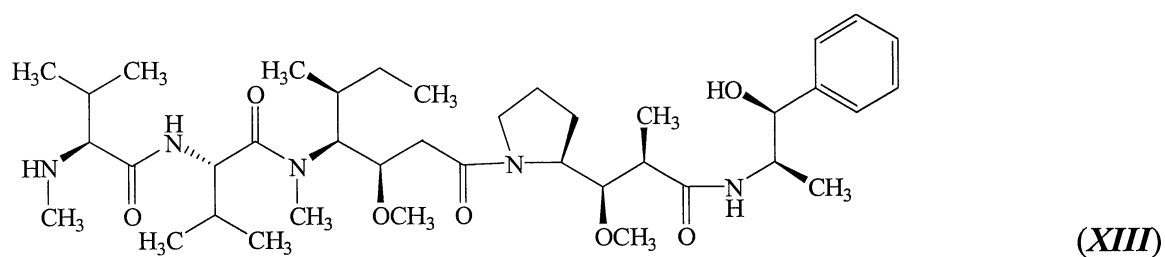
Theo một số phương án, biến Ab trong công thức (*I-1*), (*I-2*), hoặc (*I-3*) là phân tử kháng thể với các đặc điểm được tổng kết trong Bảng 1 đến 6. Theo một số phương án, biến Ab là phân tử kháng thể 5F9 hoặc phân tử kháng thể Abx-229.

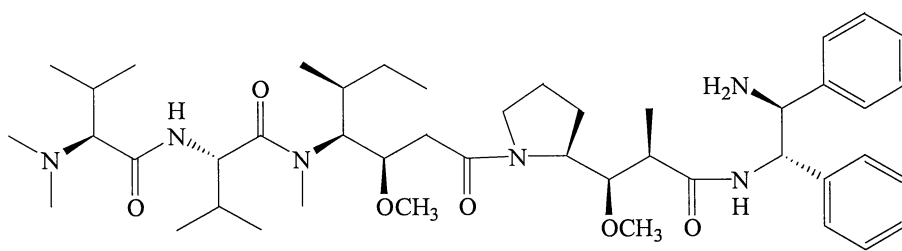
Theo một số phương án, biến *m* trong công thức (*I-1*), (*I-2*), hoặc (*I-3*) nằm trong khoảng từ 1 đến 10, từ 3 đến 7, hoặc từ khoảng 3 đến 5.

Theo một số phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến thể liên hợp miễn dịch có công thức (*I-1*), (*I-2*), hoặc (*I-3*), trong đó Ab là phân tử kháng thể 5F9 và m = khoảng 4.

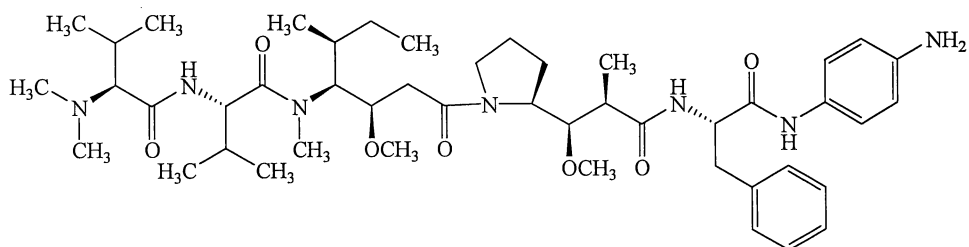
Thể liên hợp miễn dịch dolastatin và auristatin

Theo một số phương án khác, tác nhân điều trị là dolastatin. Theo một số phương án, tác nhân điều trị là auristatin, như auristatin E (cũng biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này là dẫn xuất của dolastatin-10) hoặc dẫn xuất của nó. Theo một số phương án, tác nhân điều trị là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức (*XIII*)-(*XXIII*), hoặc dạng muối được dụng của nó:

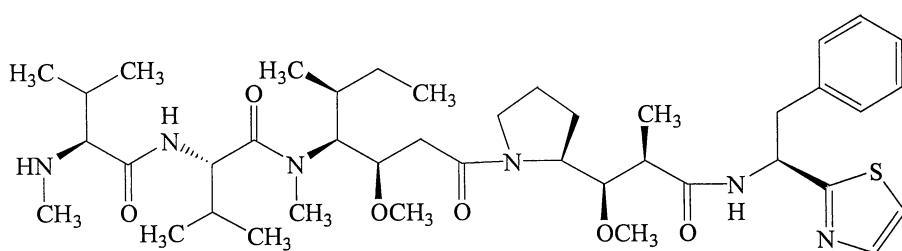




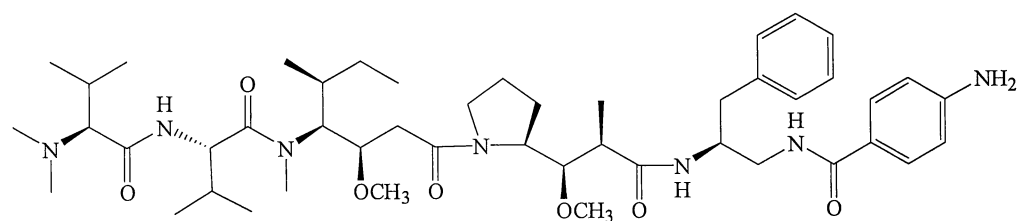
(XVII)



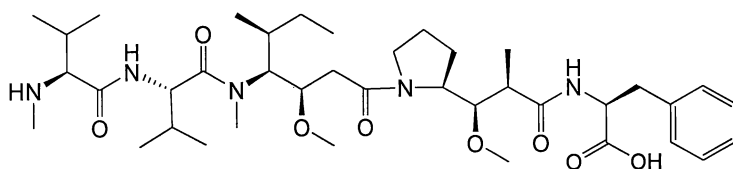
(XVIII)



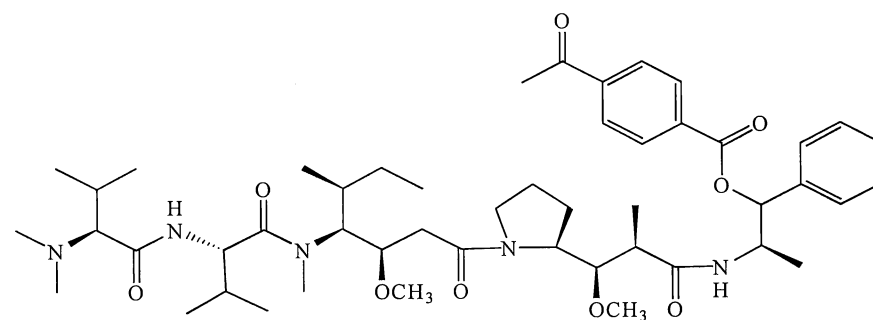
(XIX)



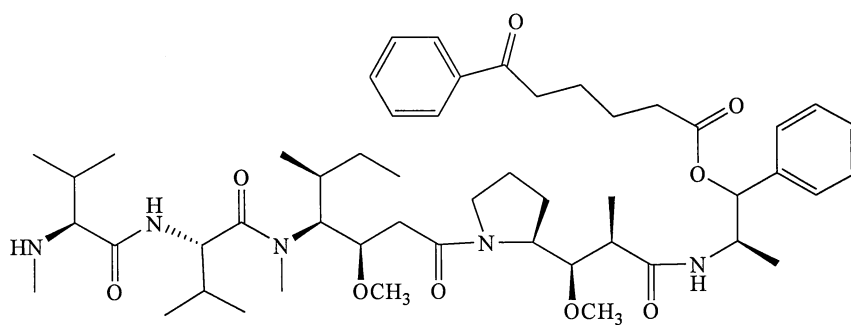
(XX)



(XXI)



(XXII)



(XXIII)

Các hợp chất auristatin và phương pháp để liên hợp chúng vào kháng thể được mô tả, ví dụ, trong Doronina et al., *Nature Biotech.*, 21: 778-784 (2003); Hamblett et al., *Clin. Cancer Res.*, 10: 7063-7070 (2004); Carter và Senter, *Cancer J.*, 14 154-169 (2008); Patent Mỹ số 7.498.298, 7.091.186, 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; và 4.486.414; Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 20090010945, 20060074008, 20080300192, 20050009751, 20050238649, và 20030083236; và Công bố đơn yêu cầu cấp Patent quốc tế số WO 04/010957 và WO 02/088172, được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Auristatin có thể, ví dụ, là este được tạo thành giữa auristatin E và ketoaxit. Ví dụ, auristatin E có thể được phản ứng với axit paraaxetyl benzoic hoặc axit benzoylvaleric để lần lượt tạo ra AEB và AEVB. Các auristatin đặc trưng khác bao gồm auristatin phenylalanin phenylendiamin (AFP; (XVIII)), monometyl auristatin E (MMAE; (XIII)), và monometyl auristatin F (MMAF; (XXI)).

Các auristatin đã được thể hiện là ảnh hưởng đến động học của các vi cấu trúc hình ống và sự phân chia nhân và tế bào và có hoạt tính chống ung thư. Các auristatin để sử dụng trong sáng chế gắn kết tubulin và có thể thể hiện hoạt tính gây độc tế bào hoặc kìm tế bào trên dòng tế bào biểu hiện GCC. Các phương pháp để xác định liệu một hợp chất có gắn kết với tubulin hay không đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Muller et al., *Anal. Chem* 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., *Molecular Pharmacology*, 1995 47: 965-976; và Hamel et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1990 265:28, 17141-17149. Với mục đích theo sáng chế, ái lực tương đối của hợp chất với tubulin có thể được xác định. Một số auristatin được ưu tiên của sáng chế gắn kết với tubulin với ái lực nằm trong khoảng từ thấp hơn 10 lần (ái lực yếu hơn) so với ái lực gắn kết của MMAE với tubulin đến cao gấp 10 lần, 20

lần hoặc thậm chí 100 lần (ái lực cao hơn) so với ái lực gắn kết của MMAE với tubulin.

Hiện có một số thử nghiệm khác nhau, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể được sử dụng để xác định liệu auristatin hoặc thể liên hợp miễn dịch thu được có biểu hiện hiệu quả kìm tế bào hoặc gây độc tế bào trên dòng tế bào mong muốn không. Ví dụ, hoạt tính gây độc tế bào hoặc kìm tế bào của thể liên hợp miễn dịch có thể được xác định bằng cách: cho tiếp xúc tế bào động vật có vú biểu hiện protein đích của thể liên hợp miễn dịch trong môi trường nuôi cấy tế bào; nuôi cấy tế bào trong một giai đoạn khoảng từ 6 giờ đến 5 ngày; và định lượng tỷ lệ sống sót của tế bào. Các thử nghiệm *in vitro* dựa trên tế bào có thể được sử dụng để định lượng tỷ lệ sống sót (tăng sinh), độ độc tế bào, và khả năng gây chết tế bào theo chương trình (hoạt hoá caspaza) của thể liên hợp miễn dịch.

Để xác định liệu thể liên hợp miễn dịch có biểu hiện hiệu quả kìm tế bào hay không, thử nghiệm cộng thymidin có thể được sử dụng. Ví dụ, các tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên đích ở mật độ 5,000 tế bào/lỗ của các đĩa 96 lỗ có thể được nuôi cấy trong giai đoạn 72 giờ và cho tiếp xúc với ^3H -thymidin 0,5 μCi trong 8 giờ cuối của giai đoạn 72 giờ. Sự cộng ^3H -thymidin vào các tế bào của môi trường nuôi cấy được định lượng với sự có mặt hoặc không có mặt của thể liên hợp miễn dịch.

Để xác định độ độc tế bào, sự hoại tử hoặc gây chết tế bào theo chương trình (gây chết tế bào theo chương trình) có thể được xác định. Sự hoại tử được đi kèm đặc trưng bởi sự tăng tính thấm của màng sinh chất; phồng tế bào, và sự vỡ màng sinh chất. Sự chết tế bào theo chương trình được đặc trưng bởi có đặc điểm là sự thủng màng, sự cô đặc bào chất, và sự hoạt hoá endonucleaza nội sinh. Việc xác định bất kỳ trong số các tác động này lên tế bào ung thư chỉ ra rằng thể liên hợp miễn dịch là hữu dụng để điều trị bệnh ung thư.

Tỷ lệ sống sót của tế bào có thể được đo bằng cách xác định trong tế bào sự hấp thu thuốc nhuộm như đỏ trung tính, xanh trypan, hoặc xanh ALAMAR™ (xem, ví dụ, Page *et al.*, 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476). Trong thử nghiệm này, các tế bào được ủ trong môi trường có thuốc nhuộm, các tế bào được rửa, và thuốc nhuộm còn lại, phản ánh lượng hấp thu thuốc nhuộm vào tế bào, được đo bằng đo quang phổ. Thuốc

nhuộm gắn kết protein sulforhodamin B (SRB) cũng có thể được sử dụng để đo độ độc tế bào (Skehan *et al.*, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

Theo cách khác, muối tetrazoli, như MTT hoặc WST, được sử dụng trong thử nghiệm đo màu định lượng đối với sự sống sót tế bào động vật có vú và sự tăng sinh bằng cách phát hiện các tế bào sống, mà không chết (xem, *ví dụ*, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

Sự chết tế bào theo chương trình có thể được định tính bằng cách đo, *ví dụ*, sự phân mảnh ADN. Các phương pháp đo trắc quang để định tính *in vitro* xác định sự phân mảnh ADN là có sẵn trên thị trường. *Ví dụ* về các thử nghiệm như vậy, bao gồm TUNEL (thử nghiệm phát hiện sự kết hợp các nucleotit đánh dấu trong các ADN phân mảnh) và thử nghiệm dựa trên ELISA, được mô tả trong *Biochemica*, 1999, số 2, trang 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

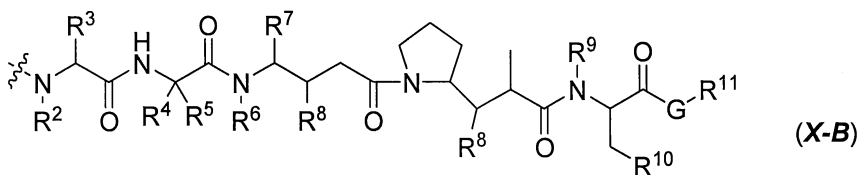
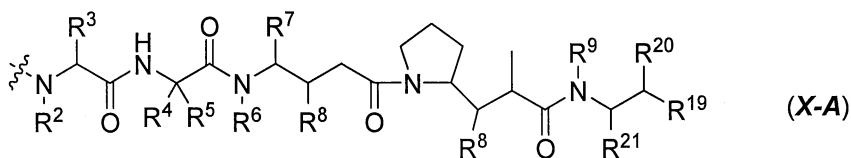
Sự chết tế bào theo chương trình cũng có thể được xác định bằng cách đo sự thay đổi hình thái trong tế bào. *Ví dụ*, như với sự hoại tử, việc mất tính nguyên vẹn của màng sinh chất có thể được xác định bằng cách đo sự hấp thu một số thuốc nhuộm (*ví dụ*, thuốc nhuộm huỳnh quang như, *ví dụ*, cam acridin hoặc etidi bromua). Phương pháp đo số lượng tế bào chết theo chương trình đã được mô tả bởi Duke và Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.* eds., 1992, trang 3.17.1-3.17.16). Các tế bào cũng có thể được đánh dấu bằng thuốc nhuộm ADN (*ví dụ*, cam acridin, etidi bromua, hoặc propidi iodua) và các tế bào được quan sát về sự đặc nhiễm sắc thể và sự bám dọc vào màng nhân bên trong. Các thay đổi hình thái khác có thể được đo để xác định sự chết tế bào theo chương trình bao gồm, *ví dụ*, sự đặc bào tương, tăng sự thủng màng, và sự co tế bào.

Sự có mặt của các tế bào chết theo chương trình có thể được đo ở cả các ngăn được gắn và “nổi lên” của dịch nuôi cấy tế bào. *Ví dụ*, cả hai ngăn này có thể được thu thập bằng cách loại tách riêng phần nổi trên bề mặt, trypsin hoá các tế bào được gắn vào, kết hợp các chế phẩm sau bước rửa ly tâm (*ví dụ*, 10 phút ở tốc độ 2000 vòng/phút), và phát hiện sự chết tế bào theo chương trình (*ví dụ*, bằng cách đo sự phân mảnh ADN). (*Xem, ví dụ*, Piazza *et al.*, 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

Hiệu quả của thể liên hợp miễn dịch có thể được kiểm tra hoặc xác nhận trong các mô hình động vật. Một số mô hình động vật ung thư được thiết lập đã được biết rõ

bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, bất kỳ mô hình nào trong số này có thể được sử dụng để thử nghiệm hiệu lực của thể liên hợp miễn dịch. Ví dụ không nhằm làm giới hạn về các mô hình này được mô tả sau đây. Hơn nữa, các mô hình động vật nhỏ để thử nghiệm hiệu lực *in vivo* của thể liên hợp miễn dịch có thể được tạo ra bằng cách cấy ghép các dòng tế bào khối u của người vào các chủng gặm nhấm thiếu hụt miễn dịch thích hợp, ví dụ, chuột trụi lông không có tuyến ức (athymic nude mice) hoặc chuột SCID.

Theo một số phương án, -Z biến đổi trong công thức (I) là gốc auristatin có công thức (X-A) hoặc công thức (X-B):



trong đó, độc lập tại mỗi vị trí:

đường gợn sóng để chỉ một liên kết;

R^2 là -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, hoặc -C₂-C₂₀ alkynyl;

R^3 là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, vòng cacbon, -C₁-C₂₀ alkylen (vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkenylen(vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkynylen(vòng cacbon), -aryl, -C₁-C₂₀ alkylen(aryl), -C₂-C₂₀ alkenylen(aryl), -C₂-C₂₀ alkynylen(aryl), -dị vòng, -C₁-C₂₀ alkylen(dị vòng), -C₂-C₂₀ alkenylen(dị vòng), hoặc -C₂-C₂₀ alkynylen(dị vòng);

R^4 là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, vòng cacbon, -C₁-C₂₀ alkylen (vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkenylen(vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkynylen(vòng cacbon), -aryl, -C₁-C₂₀ alkylen(aryl), -C₂-C₂₀ alkenylen(aryl), -C₂-C₂₀ alkynylen(aryl), -dị vòng, -C₁-C₂₀ alkylen(dị vòng), -C₂-C₂₀ alkenylen(dị vòng), hoặc -C₂-C₂₀ alkynylen(dị vòng);

R^5 là -H hoặc -C₁-C₈ alkyl;

hoặc R^4 và R^5 cùng nhau tạo ra vòng cacbon và có công thức $-(CR^aR^b)_s-$ trong đó R^a và R^b độc lập là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, hoặc -vòng cacbon và $s = 2, 3, 4, 5$ hoặc 6,

R^6 là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, hoặc -C₂-C₂₀ alkynyl;

R^7 là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, -vòng cacbon, -C₁-C₂₀ alkylen (vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkenylen(vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkynylen(vòng cacbon), -aryl, -C₁-C₂₀ alkylen(aryl), -C₂-C₂₀ alkenylen(aryl), -C₂-C₂₀ alkynylen(aryl), dị vòng, -C₁-C₂₀ alkylen(dị vòng), -C₂-C₂₀ alkenylen(dị vòng), hoặc -C₂-C₂₀ alkynylen(dị vòng);

mỗi R^8 độc lập là -H, -OH, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, -O-(C₁-C₂₀ alkyl), -O-(C₂-C₂₀ alkenyl), -O-(C₁-C₂₀ alkynyl), hoặc -vòng cacbon;

R^9 là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, hoặc -C₂-C₂₀ alkynyl;

R^{19} là -aryl, -dị vòng, hoặc -vòng cacbon;

R^{20} là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, -vòng cacbon, -O-(C₁-C₂₀ alkyl), -O-(C₂-C₂₀ alkenyl), -O-(C₂-C₂₀ alkynyl), hoặc OR^{18} trong đó R^{18} là -H, nhóm bảo vệ hydroxyl, hoặc là liên kết trực tiếp trong đó OR^{18} là =O;

R^{21} là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, hoặc -C₂-C₂₀ alkynyl, -aryl, -dị vòng, hoặc -vòng cacbon;

R^{10} là -aryl hoặc -dị vòng;

G là -O-, -S-, -NH-, hoặc -NR¹²-, trong đó R^{12} là -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl;

R^{11} là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, -aryl, -dị vòng, $-(R^{13}O)_s-R^{14}$, hoặc $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$;

s là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-1000;

R^{13} là -C₂-C₂₀ alkylen, -C₂-C₂₀ alkenylen, hoặc -C₂-C₂₀ alkynylen;

R^{14} là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, hoặc -C₂-C₂₀ alkynyl;

mỗi R^{15} độc lập là -H, -COOH, $-(CH_2)_r-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_r-SO_3H$, $-(CH_2)_r-SO_3-C_1-C_{20}$ alkyl, $-(CH_2)_r-SO_3-C_2-C_{20}$ alkenyl, hoặc $-(CH_2)_r-SO_3-C_2-C_{20}$ alkynyl;

mỗi R^{16} độc lập là -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl hoặc $-(CH_2)_t-COOH$; và

t là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6; trong đó gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkylen, alkenylen, alkynylen, aryl, carbocyl, và dị vòng nêu trên, hoặc đơn độc hoặc nằm trong nhóm khác, tùy ý được thế.

Auristatin có công thức (X-A) bao gồm các chất trong đó gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkylen, alkenylen, alkynylen, aryl, carbocyl, và dị vòng là không được thế.

Auristatin có công thức (X-A) bao gồm các chất trong đó các nhóm R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , và R^9 là không được thế và các nhóm R^{19} , R^{20} và R^{21} tùy ý được thế như mô tả ở đây.

Auristatin có công thức (X-A) bao gồm các chất trong đó

R^2 là -C₁-C₈ alkyl;

R^3 , R^4 và R^7 độc lập được chọn từ -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, đơn vòng C₃-C₆ vòng cacbon, -C₁-C₂₀ alkylen(đơn vòng C₃-C₆ vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkenylen(đơn vòng C₃-C₆ vòng cacbon), -C₂-C₂₀ alkynylen(đơn vòng C₃-C₆ vòng cacbon), -C₆-C₁₀ aryl, -C₁-C₂₀ alkylen(C₆-C₁₀ aryl), -C₂-C₂₀ alkenylen(C₆-C₁₀ aryl), -C₂-C₂₀ alkynylen(C₆-C₁₀ aryl), -dị vòng, -C₁-C₂₀ alkylen(dị vòng), -C₂-C₂₀ alkenylen(dị vòng), hoặc -C₂-C₂₀ alkynylen(dị vòng); trong đó các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkylen, alkenylen, alkynylen, vòng cacbon, aryl, và dị vòng tùy ý được thế;

R^5 là -hydro;

R^6 là -C₁-C₈ alkyl;

mỗi R^8 độc lập được chọn từ -OH, -O-(C₁-C₂₀ alkyl), -O-(C₂-C₂₀ alkenyl), hoặc -O-(C₂-C₂₀ alkynyl) trong đó các gốc alkyl, alkenyl, và alkynyl này tùy ý được thế;

R^9 là -hydro hoặc -C₁-C₈ alkyl;

R^{19} là phenyl tùy ý được thế;

R^{20} là OR^{18} ; trong đó R^{18} là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, hoặc liên kết trực tiếp trong đó OR^{18} là =O;

R^{21} được chọn từ -H, -C₁-C₂₀ alkyl, -C₂-C₂₀ alkenyl, -C₂-C₂₀ alkynyl, hoặc -vòng cacbon; trong đó các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, và vòng cacbon này tùy ý được thế; hoặc dạng muối được dụng của nó.

Các auristatin có công thức (X-A) bao gồm các chất trong đó:

R^2 là metyl;

R^3 là -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, hoặc -C₂-C₈ alkynyl, trong đó các gốc alkyl, alkenyl và alkynyl này tùy ý được thế;

R^4 là -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl, -C₂-C₈ alkynyl, C₃-C₆ vòng cacbon đơn vòng, -C₆-C₁₀ aryl, -C₁-C₈ alkylen(C₆-C₁₀ aryl), -C₂-C₈ alkenylen(C₆-C₁₀ aryl), -C₂-C₈ alkynylen(C₆-C₁₀ aryl), -C₁-C₈ alkylen (C₃-C₆ vòng cacbon đơn vòng), -C₂-C₈ alkenylen (C₃-C₆ vòng cacbon đơn vòng), -C₂-C₈ alkynylen(C₃-C₆ vòng cacbon đơn vòng); trong đó các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkylen, alkenylen, alkynylen, aryl, và vòng cacbon này hoặc một mình hoặc là một phần của nhóm khác tùy ý được thế;

R^5 là H; R^6 là metyl;

R^7 là -C₁-C₈ alkyl, -C₂-C₈ alkenyl hoặc -C₂-C₈ alkynyl;

mỗi R^8 là metoxy;

R^9 là -hydro hoặc -C₁-C₈ alkyl;

R^{19} là phenyl;

R^{20} là OR¹⁸; trong đó R^{18} là -H, nhóm bảo vệ hydroxyl, hoặc liên kết trực tiếp trong đó OR¹⁸ là =O;

R^{21} là metyl; hoặc dạng muối được dụng của nó.

Các auristatin có công thức (X-A) bao gồm các chất, trong đó:

R^2 là metyl; R^3 là H hoặc C₁-C₃ alkyl; R^4 là C₁-C₅ alkyl; R^5 là H; R^6 là metyl; R^7 là isopropyl hoặc sec-butyl; R^8 is metoxy; R^9 là hydro hoặc C₁-C₈ alkyl; R^{19} là phenyl; R^{20} is OR¹⁸; trong đó R^{18} là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, hoặc liên kết trực tiếp trong đó OR¹⁸ là =O; và R^{21} là metyl; hoặc dạng muối được dụng của nó.

Các auristatin có công thức (X-A) bao gồm các chất, trong đó:

R^2 là metyl hoặc C_1-C_3 alkyl; R^3 là H hoặc C_1-C_3 alkyl; R^4 là C_1-C_5 alkyl; R^5 là H; R^6 là C_1-C_3 alkyl; R^7 là C_1-C_5 alkyl; R^8 là C_1-C_3 alkoxy; R^9 là hydro hoặc C_1-C_8 alkyl; R^{19} là phenyl; R^{20} là OR^{18} ; trong đó R^{18} là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, hoặc liên kết trực tiếp trong đó OR^{18} là $=O$; và R^{21} là C_1-C_3 alkyl; hoặc dạng muối được dùng của nó.

Các auristatin có công thức (*X-B*) bao gồm các chất trong đó

R^2 là metyl;

R^3 , R^4 , và R^7 độc lập được chọn từ -H, $-C_1-C_{20}$ alkyl, $-C_2-C_{20}$ alkenyl, $-C_2-C_{20}$ alkynyl, C_3-C_6 vòng cacbon đơn vòng, $-C_1-C_{20}$ alkylen(C_3-C_6 vòng cacbon đơn vòng), $-C_2-C_{20}$ alkenylen(C_3-C_6 vòng cacbon đơn vòng), $-C_2-C_{20}$ alkynylen(C_3-C_6 vòng cacbon đơn vòng), $-C_6-C_{10}$ aryl, $-C_1-C_{20}$ alkylen(C_6-C_{10} aryl), $-C_2-C_{20}$ alkenylen(C_6-C_{10} aryl), $-C_2-C_{20}$ alkynylen(C_6-C_{10} aryl), -dị vòng, $-C_1-C_{20}$ alkylen(dị vòng), $-C_2-C_{20}$ alkenylen(dị vòng), hoặc $-C_2-C_{20}$ alkynylen(dị vòng); trong đó các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkylen, alkenylen, alkynylen, vòng cacbon, aryl, và dị vòng này hoặc một mình hoặc là một phần của nhóm khác tùy ý được thế;

R^5 là -H;

R^6 là metyl;

mỗi R^8 là metoxy;

R^9 là -H, $-C_1-C_{20}$ alkyl, $-C_2-C_{20}$ alkenyl, hoặc $-C_2-C_{20}$ alkynyl; trong đó các gốc alkyl, alkenyl và alkynyl này tùy ý được thế;

R^{10} là aryl tùy ý được thế hoặc dị vòng tùy ý được thế;

G là -O-, -S-, -NH-, hoặc $-NR^{12}-$, trong đó R^{12} là $-C_1-C_{20}$ alkyl, $-C_2-C_{20}$ alkenyl, hoặc $-C_2-C_{20}$ alkynyl, mỗi nhóm tùy ý được thế;

R^{11} là -H, $-C_1-C_{20}$ alkyl, $-C_2-C_{20}$ alkenyl, $-C_2-C_{20}$ alkynyl, -aryl, -dị vòng, $-(R^{13}O)_s-R^{14}$, hoặc $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$, trong đó các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, và dị vòng này tùy ý được thế;

s là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-1000;

R^{13} là $-C_2-C_{20}$ alkylen, $-C_2-C_{20}$ alkenylen, hoặc $-C_2-C_{20}$ alkynylen, mỗi nhóm tùy ý được thế;

R^{14} là $-H$, $-C_1-C_{20}$ alkyl, $-C_2-C_{20}$ alkenyl, hoặc $-C_2-C_{20}$ alkynyl trong đó các gốc alkyl, alkenyl và alkynyl này tùy ý được thế;

mỗi R^{15} độc lập là $-H$, $-COOH$, $-(CH_2)_t-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_t-SO_3H$, $-(CH_2)_t-SO_3-C_1-C_{20}$ alkyl, $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ alkenyl, hoặc $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ alkynyl trong đó các gốc alkyl, alkenyl và alkynyl này tùy ý được thế;

mỗi R^{16} độc lập là $-H$, $-C_1-C_{20}$ alkyl, $-C_2-C_{20}$ alkenyl, $-C_2-C_{20}$ alkynyl hoặc $-(CH_2)_t-COOH$ trong đó các gốc alkyl, alkenyl và alkynyl này tùy ý được thế;

t là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6; hoặc dạng muối được dùng của nó.

Theo một số phương án đó, R^{10} là phenyl tùy ý được thế;

Các auristatin có công thức (**X-B**) bao gồm các chất, trong đó các nhóm R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , và R^9 không được thế và các nhóm R^{10} và R^{11} như mô tả ở đây.

Các auristatin có công thức (**X-B**) bao gồm các chất, trong đó các gốc alkyl, alkenyl, alkynyl, alkylen, alkenylen, alkynylen, aryl, vòng cacbon, và dị vòng này không được thế.

Các auristatin có công thức (**X-B**) bao gồm các chất trong đó

R^2 là C_1-C_3 alkyl; R^3 là H hoặc C_1-C_3 alkyl; R^4 là C_1-C_5 alkyl; R^5 là H ; R^6 là C_1-C_3 alkyl; R^7 là C_1-C_5 alkyl; R^8 là C_1-C_3 alkoxy; R^9 là hydro hoặc C_1-C_8 alkyl;

R^{10} là phenyl tùy ý được thế; G là O , S , hoặc NH ; và R^{11} như được xác định trong đây; hoặc dạng muối được dùng của nó.

Các auristatin có công thức (**X-B**) bao gồm các chất, trong đó:

R^2 là metyl; R^3 là H hoặc C_1-C_3 alkyl; R^4 là C_1-C_5 alkyl; R^5 là H ; R^6 là metyl; R^7 là isopropyl hoặc sec-butyl; R^8 là metoxy; R^9 là hydro hoặc C_1-C_8 alkyl;

R^{10} là phenyl tùy ý được thế; G là O , S , hoặc NH ; và R^{11} như được xác định trong đây; hoặc dạng muối được dùng của nó.

Các auristatin có công thức (**X-B**) bao gồm các chất, trong đó:

R^2 là metyl; R^3 là H hoặc C_1 - C_3 alkyl; R^4 là C_1 - C_5 alkyl; R^5 là H; R^6 là metyl; R^7 là isopropyl hoặc sec-butyl; R^8 là metoxy; R^9 là hydro hoặc C_1 - C_8 alkyl; R^{10} là phenyl; và G là O hoặc NH và R^{11} như được xác định trong đây, tốt hơn là hydro; hoặc dạng muối được dụng của nó.

Các auristatin có công thức (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó:

R^2 là C_1 - C_3 alkyl; R^3 là H hoặc C_1 - C_3 alkyl; R^4 là C_1 - C_5 alkyl; R^5 là H; R^6 là C_1 - C_3 alkyl; R^7 là C_1 - C_5 alkyl; R^8 là C_1 - C_3 alkoxy; R^9 là hydro hoặc C_1 - C_8 alkyl; R^{10} là phenyl; và G là O hoặc NH và R^{11} như được xác định trong đây, tốt hơn là hydro; hoặc dạng muối được dụng của nó.

Các auristatin có công thức (*X-A*) hoặc (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó R^3 , R^4 và R^7 độc lập là isopropyl hoặc sec-butyl và R^5 là -H. Theo một phương án ví dụ, mỗi R^3 và R^4 là isopropyl, R^5 là H, và R^7 là sec-butyl. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

Các auristatin có công thức (*X-A*) hoặc (*X-B*) bao gồm các chất trong đó mỗi R^2 và R^6 là metyl, và R^9 là H. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

Các auristatin có công thức (*X-A*) hoặc (*X-B*) bao gồm các chất trong đó mỗi R^8 là -OCH₃. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

Các auristatin có công thức (*X-A*) hoặc (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó mỗi R^3 và R^4 là isopropyl, mỗi R^2 và R^6 là metyl, R^5 là H, R^7 là sec-butyl, mỗi R^8 là -OCH₃, và R^9 là H. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

Các auristatin có công thức (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó G là -O- hoặc -NH-. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

Các auristatin có công thức (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó R^{10} là aryl. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

Các auristatin có công thức (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó R^{10} là -phenyl. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

Các auristatin có công thức (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó G là -O-, và R^{11} là H, metyl hoặc t-butyl. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

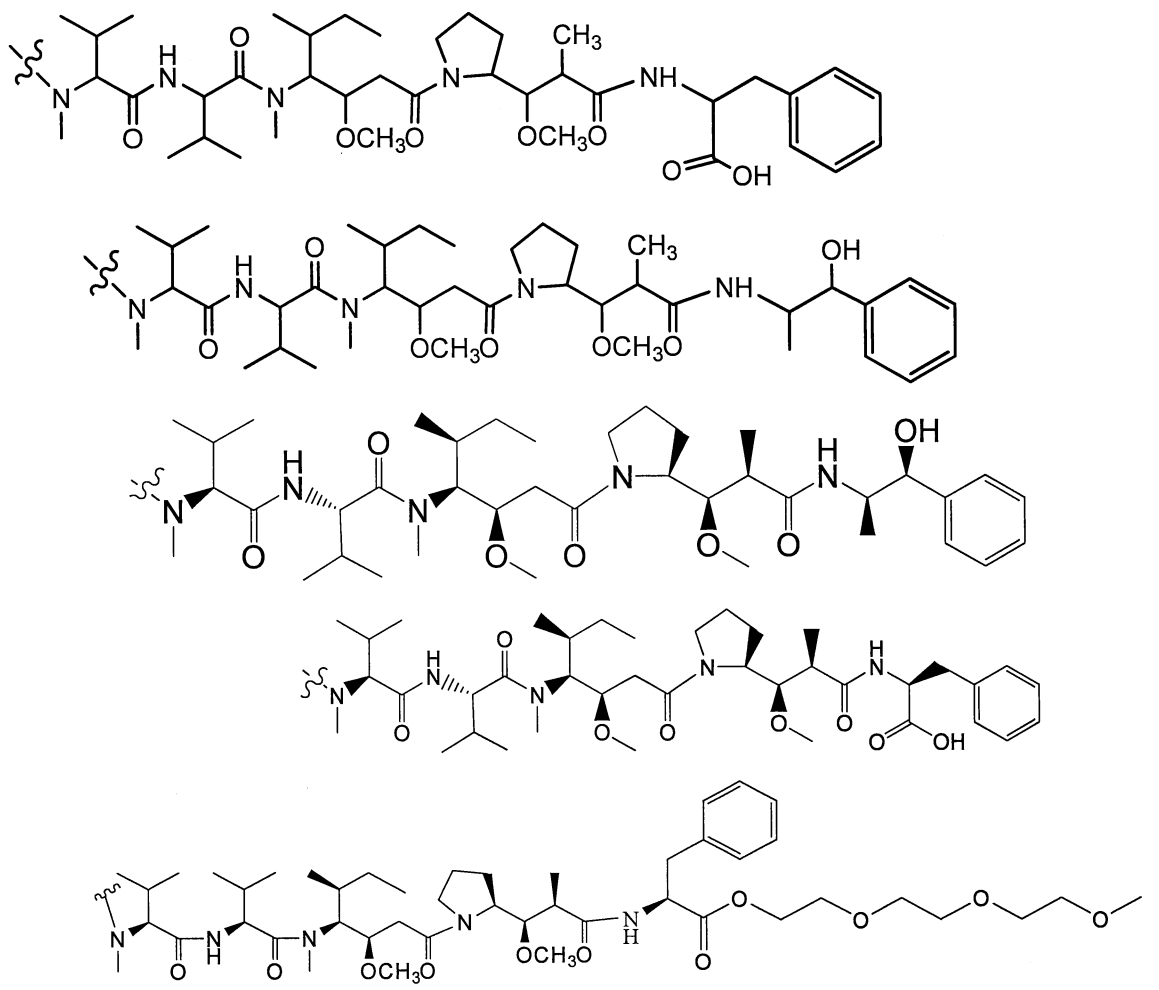
Các auristatin có công thức (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó khi **G** là -NH, R^{11} là $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$, trong đó R^{15} là $-(CH_2)_r-N(R^{16})_2$, và R^{16} là $-C_1-C_8$ alkyl hoặc $-(CH_2)_r-COOH$. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

Các auristatin có công thức (*X-B*) bao gồm các chất, trong đó khi **G** là -NH, R^{11} là $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$, trong đó R^{15} là H hoặc $-(CH_2)_r-SO_3H$. Các phần tử thể còn lại như được xác định trong đây.

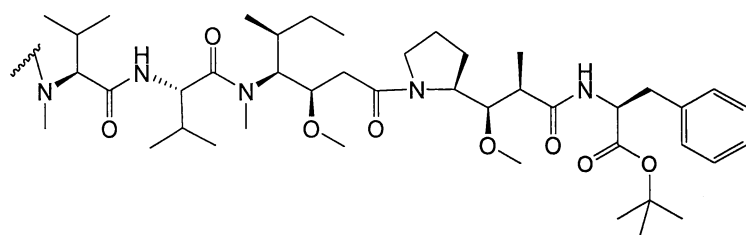
Theo các phương án ưu tiên của thể liên hợp miễn dịch có công thức (*II*), khi **Z** là phân tử auristatin có công thức (*X-A*), w là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 12, tốt hơn là từ 2 đến 12, y=1 hoặc 2, và a tốt hơn là =1.

Theo một số phương án về thể liên hợp miễn dịch có công thức (*II*), khi **Z** là phân tử auristatin có công thức (*X-B*), a=1 và w và y = 0.

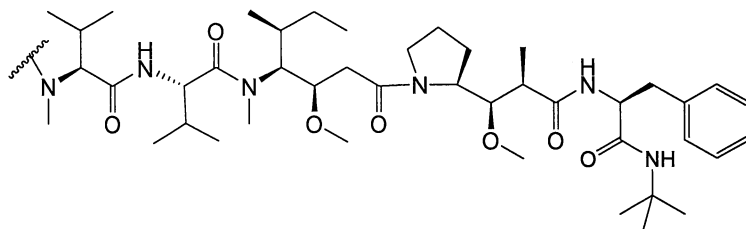
Các tác nhân điều trị minh hoạ (-**Z**) bao gồm các chất có cấu trúc sau:



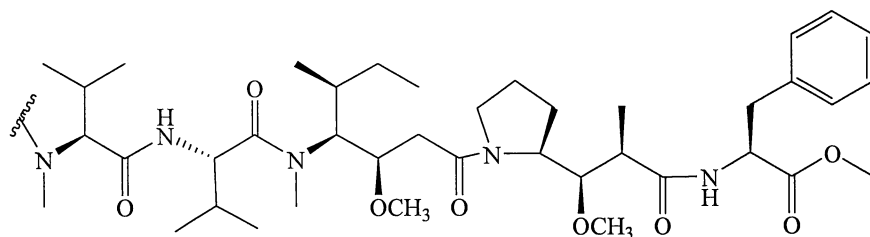
21857



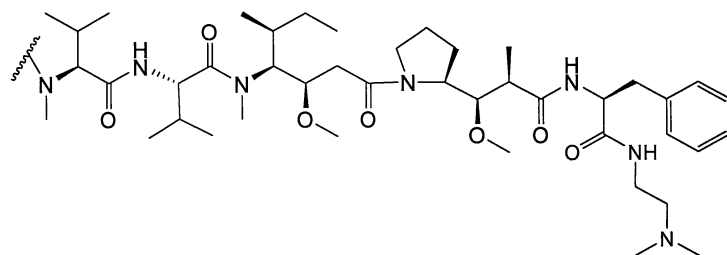
,



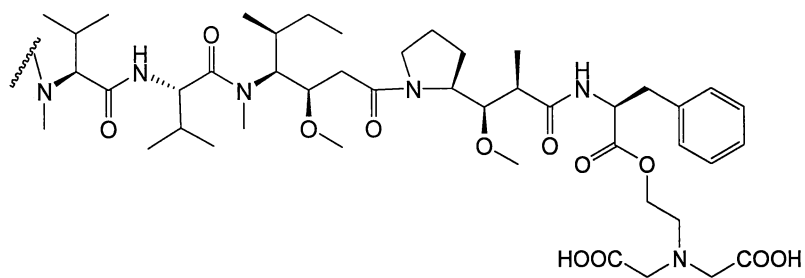
,



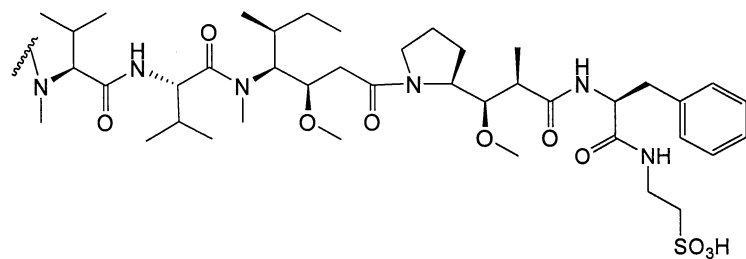
,



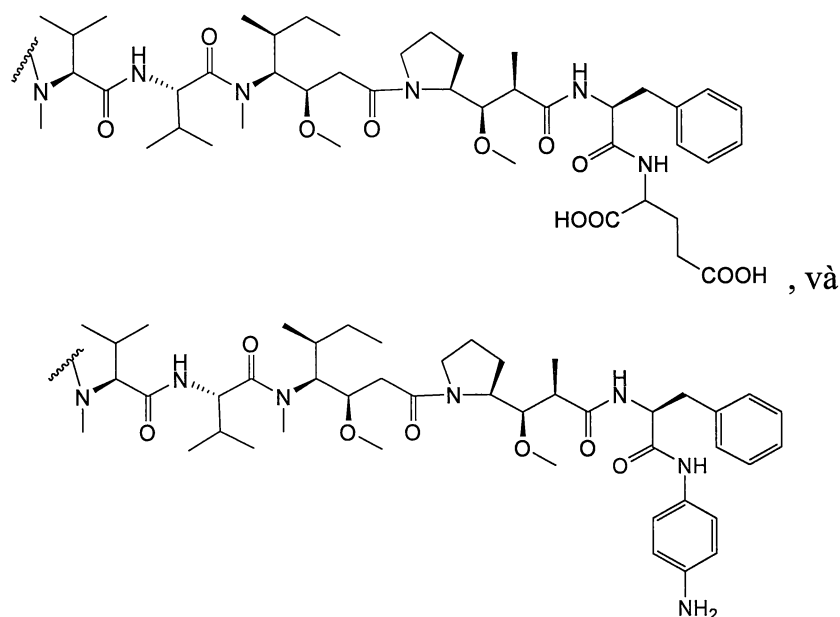
,



,



,



Theo một khía cạnh, các nhóm ưa nước, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trietylen glycol (TEG) có thể được gắn với phân tử auristatin có công thức (**X-B**) ở R¹¹. Không bị giới hạn ở lý thuyết, các nhóm ưa nước trợ giúp sự nội hoá và không kết tụ tác nhân điều trị.

Theo một số phương án, tác nhân điều trị không phải là TZT-1027. Theo một số phương án, tác nhân điều trị không phải là auristatin E, dolastatin 10, hoặc auristatin PE.

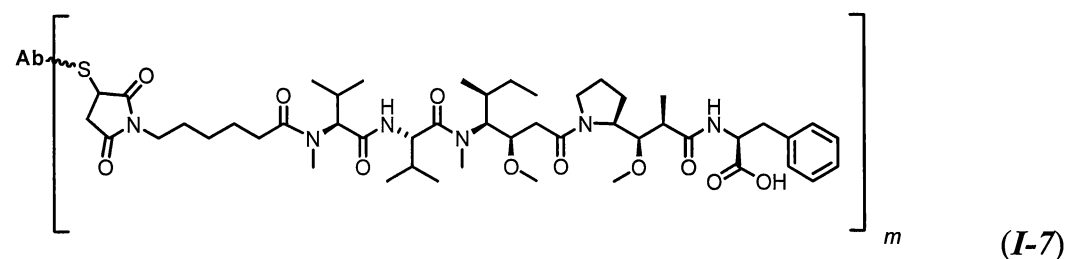
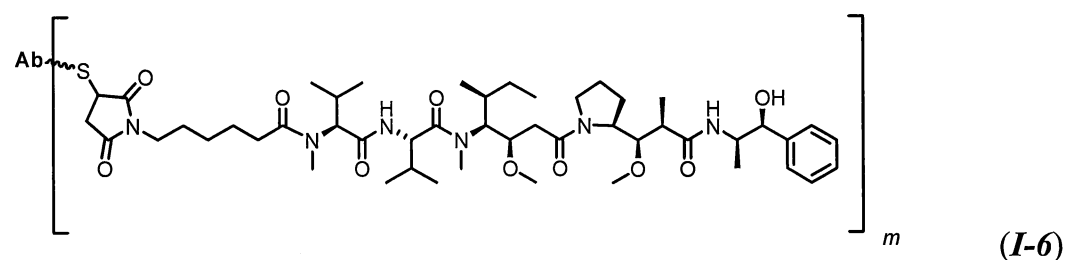
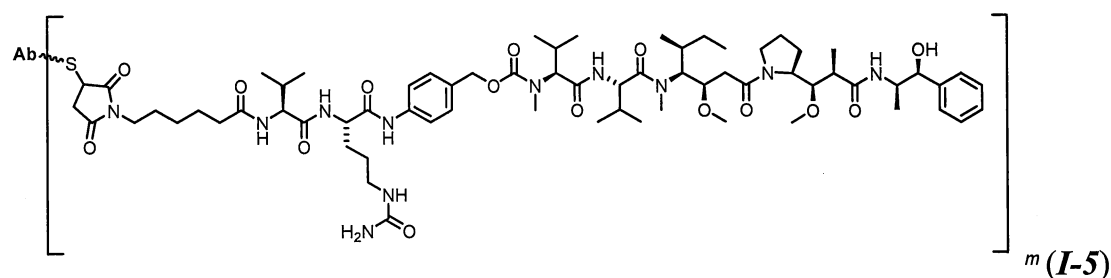
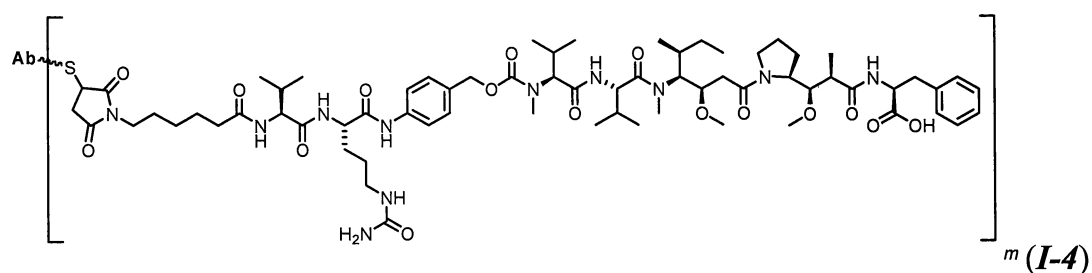
Theo một số phương án, phân tử auristatin được gắn kết với gốc xystein trên phân tử kháng thể bằng đoạn liên kết chứa gốc maleimit, ví dụ, gốc maleimitocaproyl.

Theo một số phương án, phân tử auristatin được kết hợp với kháng thể bằng một đoạn liên kết hai nhóm chức khác loại được nối với nhóm hydroxyl trên phân tử auristatin. Theo một số phương án, đoạn liên kết bao gồm hydrazon. Theo một số phương án, đoạn liên kết là hợp chất hydrazon được tạo ra bằng phản ứng của maleimitocaproylhydrazit và axit ketocarboxylic, ví dụ, axit 5-benzoylvaleric. Theo các phương án cụ thể, đoạn liên kết là axit (Z)-6-(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl)hydrazono)-6-phenylhexanoic.

Theo một số phương án khác, phân tử auristatin được kết hợp với kháng thể bằng một đoạn liên kết hai nhóm chức khác loại được nối với nhóm monometyl amin trên phân tử auristatin. Theo một số phương án, đoạn liên kết bao gồm gốc phân tách được, ví dụ, gốc peptit, và nhóm đệm *p*-aminobenzylcarbamate tự phân huỷ. Các đoạn

liên kết, ví dụ bao gồm, maleimitocaproyl (mc), maleimitocaproyl-L-phenylalanin-L-lysine-*p*-aminbenzylcarbamate, và maleimitocaproyl-L-valine-L-xitrulin-*p*-aminbenzylcarbamate (vc).

Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch có công thức (**I**) được đặc trưng bởi công thức Ab-(vc-MMAF)_m (công thức (**I-4**)); Ab-(vc-MMAE)_m (công thức (**I-5**)); Ab-(mc-MMAE)_m (công thức (**I-6**)); hoặc Ab-(mc-MMAF)_m, (công thức (**I-7**)), trong đó Ab là phân tử kháng thể kháng GCC như được mô tả ở đây, S là nguyên tử lưu huỳnh của kháng thể, và *m* có các giá trị và giá trị ưu tiên được mô tả ở trên đối với công thức (**I**). Theo một số phương án, *m* là số nguyên từ 1 đến 5.



Theo một số phương án, Ab biến đổi trong công thức (I-4), (I-5), (I-6), hoặc (I-7) là phân tử kháng thể với các đặc điểm được tóm tắt trong Bảng 1 đến 6. Theo một

số phương án, Ab biến đổi là phân tử kháng thể 5F9 hoặc là phân tử kháng thể Abx-229.

Theo một số phương án, m biến đổi trong công thức (I-4), (I-5), (I-6), hoặc (I-7) nằm trong khoảng từ 2 đến 10, từ khoảng 6 đến 8, hoặc từ khoảng 4 đến 6.

Theo một số phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến thể liên hợp miễn dịch có công thức (I-4), (I-5), (I-6), hoặc (I-7), trong đó Ab là phân tử kháng thể 5F9 và m khoảng 4.

Thể liên hợp miễn dịch được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng để điều biến đáp ứng sinh học. Tác nhân điều trị không được hiểu nhằm để giới hạn ở, các tác nhân điều trị hoá học cổ điển. Ví dụ, tác nhân điều trị có thể là axit nucleic, protein, hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học mong muốn. Ví dụ, phân tử kháng thể có thể được liên hợp với một phân tử đối nghĩa, phân tử siARN, phân tử shARN hoặc phân tử miARN có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của một gen, bằng cách đó tạo ra được tác động sinh học mong muốn.

Các protein và polypeptit có thể được liên hợp với các phân tử kháng thể theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các độc tố và các thành phần của nó, như abrin, chuỗi abrin A, rixin, chuỗi rixin A, modecxin, chuỗi modecxin A, alpha-sarcin, ngoại độc tố A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), PE38 (ngoại độc tố pseudomonas được cắt cụt), gelonin, độc tố bạch cầu, mảnh độc tố bạch cầu A, một số protein *Aleurites fordii*, một số protein *Dianthus caryophyllus* (ví dụ, dianthin 30 và dianthin 32), một số protein *Phytolacca Americana* (ví dụ, PAP, PAPII, và PAP-S), một số protein *Saponaria officinalis* (ví dụ, saporin 6), chất ức chế *Momordica charantia*, curcin, crotin, mitoginlin, restrictoxin, phenomyxin, và enomyxin; protein để hoạt hóa hệ miễn dịch ở các khối u hoặc gây ra chức năng kích ứng ở khối u, như yếu tố hoại tử khối u, interferon, yếu tố tăng trưởng thần kinh, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu, và chất hoạt hoá plasminogen mô; và chất điều chỉnh đáp ứng sinh học như, ví dụ, xytokin và lymphokin (ví dụ, interleukin-1 (“IL-1”), interleukin-2 (“IL-2”), interleukin-6 (“IL-6”), yếu tố kích thích cụm bạch cầu hạt đại thực bào (“GM-CSF”), và yếu tố kích thích cụm bạch cầu hạt (“G-CSF”)), và các yếu tố tăng trưởng khác.

Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được liên hợp hoặc dung hợp với các protein bề mặt virus trình diện trên các hạt virus. Ví dụ, kháng thể kháng GCC chuỗi

đơn theo sáng chế có thể được dung hợp (ví dụ, để tạo ra protein dung hợp) với protein bề mặt virus. Theo cách khác, kháng thể kháng GCC nguyên vẹn theo sáng chế, hoặc mảnh của nó, có thể được nối về mặt hoá học (ví dụ, thông qua liên kết hoá học) với protein bề mặt virus. Tốt hơn là, virus này là virus dung hợp với màng thể vùi tế bào, ví dụ, virus cúm, sao cho virus này được nội hóa cùng với kháng thể kháng GCC và bằng cách đó gây nhiễm cho tế bào biểu hiện GCC. Virus này có thể được xử lý kỹ thuật di truyền dưới dạng độc tố tế bào. Ví dụ, virus này có thể biểu hiện hoặc kích thích biểu hiện các gen gây độc cho các tế bào, ví dụ, các gen thúc đẩy sự chết tế bào. Tốt hơn là, các virus như vậy sẽ không có khả năng sao chép virus.

Phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây cũng có thể được liên hợp với tiền chất hoặc chất hoạt hoá tiền chất. Theo phương pháp để diệt hoặc ức chế tế bào khối u, đầu tiên phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế được liên hợp với tiền chất mà được hoạt hóa chỉ khi tiếp xúc gần với chất hoạt hoá tiền chất. Chất hoạt hoá tiền chất được liên hợp với phân tử kháng thể thứ hai, tốt hơn là phân tử kháng thể này gắn kết với vị trí không cạnh tranh trên phân tử GCC. Việc hai kháng thể gắn kết các vị trí gắn kết cạnh tranh hoặc không cạnh tranh có thể được xác định bởi các thử nghiệm gắn kết thông thường.

Các cặp được chất-tiền được chất thích hợp để sử dụng cho thực hành sáng chế được mô tả trong Blakely et al., "ZD2767, an Improved System for Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy That Results in Tumor Regressions in Colorectal Tumor Xenografts," (1996) *Cancer Research*, 56:3287-3292.

Các isotop phóng xạ có tác dụng điều trị bệnh cũng có thể được kết hợp với kháng thể kháng GCC, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc dẫn xuất của chúng. Isotop phóng xạ có thể được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán hoặc điều trị. Isotop phóng xạ có thể được kết hợp với kháng thể kháng GCC bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở α -, β -, hoặc γ -nguồn bức xạ, hoặc β - và γ -nguồn bức xạ. Xem, ví dụ, S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (eds.), trang 303-316 (Academic Press 1985). Isotop phóng xạ như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đồng (^{64}Cu), iot (^{131}I hoặc ^{125}I), ytri (^{90}Y), luteti (^{177}Lu), actini (^{225}Ac), praseodym, astatin (^{211}At),

reni (^{186}Re), bismuth (^{212}Bi hoặc ^{213}Bi), indi (^{111}In), tecneti ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), phospho (^{32}P), rođi (^{188}Rh), lưu huỳnh (^{35}S), cacbon (^{14}C), triti (^3H), crom (^{51}Cr), clo (^{36}Cl), coban (^{57}Co hoặc ^{58}Co), sắt (^{59}Fe), selen (^{75}Se), hoặc gali (^{67}Ga). Isotop phóng xạ hữu dụng là tác nhân điều trị bao gồm ytri (^{90}Y), luteti (^{177}Lu), actini (^{225}Ac), praseodym, astatin (^{211}At), reni (^{186}Re), bismuth (^{212}Bi hoặc ^{213}Bi), và rođi (^{188}Rh). Isotop phóng xạ hữu dụng là chất đánh dấu, ví dụ, để sử dụng trong chẩn đoán, bao gồm iot (^{131}I hoặc ^{125}I), indi (^{111}In), tecneti ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), phospho (^{32}P), cacbon (^{14}C), và triti (^3H), hoặc một hoặc nhiều isotop điều trị được nêu trên.

Liệu pháp phóng xạ miễn dịch (RIT-Radioimmunotherapy) bằng cách sử dụng kháng thể được đánh dấu bằng ^{131}I , ^{90}Y , và ^{177}Lu được kiểm tra lâm sàng chuyên sâu. Có sự khác biệt đáng kể về đặc điểm vật lý của ba nuclit và kết quả là, lựa chọn nuclit phóng xạ có thể là quan trọng để phân phối lượng phóng xạ tối đa cho khối u. Các hạt năng lượng beta cao hơn ^{90}Y có thể là tốt cho các khối u lớn, nhưng không cần thiết cho các khối u nhỏ và đặc biệt là bệnh di căn xương. Các hạt beta năng lượng thấp tương đối của ^{131}I là lý tưởng, tuy nhiên việc khử halogen hoá *in vivo* của các phân tử iot phóng xạ là một bất lợi lớn đối với các kháng thể nội hóa. Ngược lại, ^{177}Lu có hạt beta năng lượng thấp với khoảng chỉ là 0,2-0,3 mm và các hạt phân phối có liều phóng xạ tới tủy xương thấp hơn nhiều so với ^{90}Y . Ngoài ra, do chu kỳ bán rã vật lý dài hơn (so với ^{90}Y), thời gian giữ lại trong khối u sẽ cao hơn. Kết quả là, các hoạt tính cao hơn (nhiều lượng mCi hơn) của tác nhân đánh dấu ^{177}Lu có thể được sử dụng với liều phóng xạ nhỏ hơn tương đối vào tủy. Có nhiều nghiên cứu lâm sàng nghiên cứu việc sử dụng các kháng thể đánh dấu ^{177}Lu trong điều trị các bệnh ung thư khác nhau. (Mulligan T et al. *Clin Cancer Res.* 1: 1447-1454(1995); Meredith RF, et al. *J Nucl Med* 37:1491-1496(1996); Alvarez RD, et al. *Gynecologic Oncology* 65: 94-101(1997)).

Các tác nhân có thể phát hiện hữu dụng mà một kháng thể hoặc một phần kháng thể theo sáng chế có thể được tạo dẫn xuất (hoặc đánh dấu) với chúng bao gồm các hợp chất huỳnh quang, enzym khác nhau, các nhóm giả, nguyên liệu huỳnh quang, nguyên liệu huỳnh quang sinh học, nguyên tử kim loại phát huỳnh quang, ví dụ, europi (Eu), và các anthanit, và các nguyên liệu hoạt động phóng xạ (được mô tả ở trên). Các tác nhân huỳnh quang phát hiện được bao gồm floresxein, floresxein isothioxyanat, rhodamin, 5-dimetylamin-1-napthalensulfonyl clorua, phycoerythrin và tương tự.

Kháng thể cũng có thể được tạo dẫn xuất với enzym phát hiện được, như phosphataza kiềm, peroxidaza cải ngựa, β -galactosidaza, axetylcholinesteraza, glucoza oxidaza và tương tự. Khi một kháng thể được tạo dẫn xuất với enzym phát hiện được, nó có thể phát hiện được bằng cách bổ sung các thuốc thử bổ sung mà enzym sử dụng để tạo ra sản phẩm phản ứng có thể phát hiện được. Ví dụ, khi tác nhân phát hiện được là peroxidaza cải ngựa có mặt, việc bổ sung hydro peroxit và diaminobenzidin dẫn đến sản phẩm phản ứng có màu, là chất có thể phát hiện. Một kháng thể cũng có thể được tạo dẫn xuất với nhóm giả (ví dụ, streptavidin/biotin và avidin/biotin). Ví dụ, một kháng thể có được tạo dẫn xuất với biotin, và được phát hiện bằng cách đo gián tiếp sự gắn kết avidin hoặc streptavidin. Ví dụ về các nguyên liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferon, floresxein, floresxein isothioxyanat, rhodamin, diclotriazinylamin floresxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ về nguyên liệu huỳnh quang bao gồm luminol; và ví dụ về nguyên liệu huỳnh quang sinh học bao gồm luciferaza, luciferin, và aequorin.

Dược phẩm

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, các chế phẩm dược dụng, bao gồm phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của nó, như được mô tả ở đây, được tạo công thức cùng với chất mang dược dụng. Theo các phương án, phân tử kháng thể kháng GCC là phân tử với các đặc điểm ví dụ được tổng kết trong Bảng 1 và 2.

Như sử dụng trong đây, “chất mang dược dụng” bao gồm tất cả dung môi bất kỳ, môi trường phân tán, tác nhân làm chậm hấp thu và đẳng trương, và tương tự có thể tương thích về mặt sinh lý. Chất mang có thể thích hợp để sử dụng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hoá, tại trực tràng, cột sống hoặc tại biểu bì (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền). Dược phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều tá dược bổ sung, ví dụ, muối, chất đệm, chất điều chỉnh trương lực, chất bảo quản đông lạnh, chất tẩy không ion, chất hoạt động bề mặt, và chất bảo quản.

Các chế phẩm này cũng có thể ở nhiều dạng. Chúng bao gồm, ví dụ, dạng liều lỏng, bán rắn và dạng liều rắn, như các dung dịch lỏng (ví dụ, dung dịch tiêm được và truyền được), hệ phân tán hoặc huyền phù, liposom và thuốc đặt. Dạng được ưu tiên phụ thuộc vào kiểu đường dùng dự tính và ứng dụng điều trị. Một số chế phẩm đặc

trung là ở dạng dung dịch tiêm được hoặc truyền được, dự tính để sử dụng ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong màng bụng, trong cơ). Theo một số phương án, kháng thể này được sử dụng bằng cách tiêm hoặc truyền tĩnh mạch. Theo các phương án khác, kháng thể được sử dụng bằng cách tiêm trong cơ hoặc dưới da.

Thuật ngữ “sử dụng ngoài đường tiêu hoá” và “dùng ngoài đường tiêu hoá” như sử dụng trong đây có nghĩa là kiểu đường dùng không phải là sử dụng tại chỗ và trong ruột, thường là bằng cách tiêm, và bao gồm, không giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong vỏ não, trong bao, trong hốc mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, ngoài màng cứng và tiêm trong xương ức.

Theo một số phương án, dược phẩm là vô khuẩn và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Dược phẩm này có thể được tạo công thức là dung dịch, vi nhũ tương, hệ phân tán, liposom, trung thể, hoặc cấu trúc có trật tự khác thích hợp với nồng độ kháng thể cao. Các dung dịch tiêm được vô khuẩn có thể được điều chế bằng cách đưa hoạt chất (*tức là*, kháng thể hoặc phân kháng thể) với lượng yêu cầu vào trong dung môi thích hợp với một hoặc hỗn hợp các thành phần đã nêu trên, như yêu cầu, sau khi diệt khuẩn, ví dụ, bằng cách lọc. Nói chung, các hệ phân tán được điều chế bằng cách đưa hoạt chất vào trong chất dẫn vô khuẩn chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần khác được yêu cầu từ các thành phần nêu trên. Trong trường hợp các bột vô khuẩn của chế phẩm dung dịch vô khuẩn tiêm được, các phương pháp điều chế đã biết là sấy chân không và sấy đông khô để tạo ra bột chứa thành phần hoạt tính và thành phần mong muốn khác bất kỳ từ dung dịch được lọc vô khuẩn trước đó chứa chúng. Độ lỏng thích hợp của dung dịch có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng màng bao như lexitin, bằng cách duy trì cỡ hạt mong muốn trong trường hợp hệ phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Sự hấp thu kéo dài của các chế phẩm tiêm được có thể được mang lại bằng cách đưa vào dược phẩm tác nhân làm chậm hấp thu, ví dụ, muối monostearat và gelatin.

Kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, mặc dù với nhiều mục đích điều trị, đường dùng/kiểu dùng là tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ, đường dùng và/hoặc kiểu

dùng sẽ phụ thuộc nhiều vào kết quả mong muốn. Theo một số phương án, hoạt chất có thể được điều chế với chất mang sẽ bảo vệ hợp chất không giải phóng nhanh, như được phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm thuốc cấy, miếng dán tác dụng qua da, và các hệ phân phối thuốc vi bao nang. Các polyme phân huỷ sinh học, tương thích sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp để điều chế được phẩm như vậy đã được bảo hộ hoặc được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, *Sustained và Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Theo một số phương án, phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây có thể được sử dụng qua đường miệng, ví dụ, với một chất pha loãng trợ hoặc chất mang có thể tiêu hoá. Hợp chất (và các thành phần mong muốn khác) cũng có thể được đưa vào viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm, nén thành viên nén, viên ngậm, viên tròn, viên nang, viên ngọt, huyền phù, sirô, viên nhện, và tương tự. Để sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế bằng ngoài đường dùng ngoài đường tiêu hoá, có thể cần bao hợp chất bằng, hoặc sử dụng đồng thời hợp chất này với, nguyên liệu để ngăn cản sự bất hoạt của nó.

Dược phẩm có thể được sử dụng với các thiết bị y tế đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, dược phẩm có thể được bố trí trong một thiết bị, ví dụ, vật chứa kín khí hoặc kín lỏng, chứa một hoặc nhiều liều. Ví dụ về các thiết bị phân phối thuốc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ống, ống thông, kim, túi truyền, và dây dẫn. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp đưa phân tử kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây vào các thiết bị như vậy.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây, được bào chế thành chế phẩm liposom. Theo một số phương án, liposom được bao bằng phân tử kháng thể. Theo một số phương án, liposom được nạp đầy tác nhân điều trị. Sự phân phối liposom có thể cho phép phân phối tác nhân, ví dụ, tác nhân điều trị, không liên kết với kháng thể. Phương pháp này có thể được sử dụng để phân phối tác nhân, ví dụ, tác nhân điều trị, mà nó không tuân theo liên kết chéo với phân tử kháng thể hoặc tác nhân, ví dụ, tác nhân điều trị, được cô lập, hoặc tiếp xúc với các tế bào không phải là đích có thể được tối thiểu hoá. Theo các phương án cụ thể, liposom được nạp bởi tác nhân kim tế bào hoặc gây độc tế bào.

Theo một số phương án cụ thể, tác nhân điều trị được chọn từ nhóm bao gồm maytansinoid, auristatin, dolastatin, duocarmyxin, cryptophycin, taxan, tác nhân alkyl hoá ADN calicheamixin, và dẫn xuất của chúng. Theo các phương án khác, liposom được nạp bằng trình tự axit nucleic bao gồm các phân tử ARN can thiệp (RNA interference), ví dụ, các phân tử đối nghĩa, các phân tử siARN, hsARN hoặc miARN, có khả năng làm giảm sự biểu hiện GCC hoặc sự biểu hiện gen khác, ví dụ, gen gây bệnh ung thư, trong tế bào biểu hiện GCC. Theo một số phương án khác, liposom được bao hoặc nạp bằng thể liên hợp miễn dịch bao gồm phân tử kháng thể kháng GCC và tác nhân điều trị hoặc chất đánh dấu.

Chế độ dùng thuốc được điều chỉnh để cung cấp đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, tiêm một liều nhanh có thể được sử dụng, vài liều chia nhỏ có thể được sử dụng trong một thời gian hoặc liều có thể giảm hoặc tăng dần theo độ khẩn cấp của tình trạng bệnh. Đặc biệt có lợi khi bào chế các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá ở dạng liều đơn vị để tiện sử dụng và sự ổn định liều. Thuật ngữ “dạng liều đơn vị,” như sử dụng trong đây, để chỉ các đơn vị riêng lẻ về mặt vật lý thích hợp là các liều đơn vị cho các đối tượng được điều trị bệnh; mỗi đơn vị chứa lượng đã định của hoạt chất được tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn cùng với chất mang được dùng yêu cầu. Chỉ định của các liều đơn vị theo sáng chế được kê đơn và phụ thuộc trực tiếp vào (a) đặc điểm riêng của hoạt chất và hiệu quả điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) giới hạn vốn có trong lĩnh vực kỹ thuật điều chế hoạt chất để xử lý độ mất cảm cho các đối tượng.

Khoảng ví dụ, không giới hạn về lượng có hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,1-20mg/kg, hoặc 1-10mg/kg. Lưu ý rằng các giá trị liều có thể thay đổi theo cách và mức độ nặng của bệnh cần được thuyên giảm. Hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ liều cụ thể nên được điều chỉnh theo thời gian theo nhu cầu cụ thể và điều chỉnh chuyên môn của người kê đơn hoặc giám sát việc sử dụng chế phẩm, và khoảng liều nêu trong đây chỉ nhằm làm ví dụ và không làm giới hạn phạm vi hoặc thực hành của chế phẩm.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm lượng có “hiệu quả điều trị” của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế. Lượng có “hiệu quả điều trị” để chỉ lượng có hiệu quả, ở các liều và trong các giai đoạn thời gian cần thiết, để

đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh kháng thể biến đổi có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, tuổi, giới tính, và trọng lượng của cá thể, và khả năng của kháng thể hoặc phân kháng thể để gây ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng có hiệu quả điều trị cũng là lượng trong đó hiệu quả gây độc hoặc có hại bất kỳ của kháng thể hoặc mảnh kháng thể biến đổi bị lấn lướt bởi hiệu quả có lợi cho điều trị. "Liều có hiệu quả điều trị" tốt hơn là ức chế thông số đo được (ví dụ, tốc độ tăng trưởng khối u) ở các đối tượng được điều trị bởi ít nhất ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 60%, và theo một số phương án ít nhất khoảng 80%, tương ứng với đối tượng được điều trị. Khả năng của hợp chất để ức chế thông số đo được, ví dụ, bệnh ung thư, có thể được đánh giá trong hệ mô hình động vật về hiệu quả trên các khối u ở người. Theo cách khác, đặc tính của chế phẩm có thể được đánh giá bằng cách kiểm tra khả năng hợp chất này ức chế, sự ức chế *in vitro* như vậy bằng các thử nghiệm đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ.

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là kit bao gồm phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch như mô tả ở đây. Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa các chế phẩm liposom bao gồm phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch. Kit có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần khác bao gồm: hướng dẫn sử dụng; thuốc thử khác, ví dụ, chất đánh dấu, tác nhân điều trị, hoặc tác nhân hữu dụng để chelat hoá, hoặc cách khác là kết hợp, kháng thể với chất đánh dấu hoặc tác nhân điều trị, hoặc chế phẩm bảo vệ phóng xạ; các thiết bị hoặc nguyên liệu khác để điều chế kháng thể để sử dụng; chất mang dược dụng; và thiết bị hoặc các nguyên liệu để sử dụng cho đối tượng. Hướng dẫn sử dụng cũng có thể bao gồm hướng dẫn cho ứng dụng chẩn đoán của phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch để phát hiện GCC, *in vitro*, ví dụ, trong mẫu, ví dụ, mẫu sinh thiết hoặc các tế bào từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư, hoặc *in vivo*. Các hướng dẫn có thể bao gồm hướng dẫn điều trị bao gồm liều khuyến cáo và/hoặc đường dùng, ví dụ, ở bệnh nhân mắc bệnh ung thư (ví dụ, ung thư dạ dày, như, ví dụ, ung thư ruột kết, ung thư dạ dày, ung thư thực quản). Các hướng dẫn khác có thể bao gồm hướng dẫn kết hợp kháng thể với chất tạo chelat, chất đánh dấu hoặc tác nhân điều trị, hoặc để tinh chế kháng thể liên hợp, ví dụ, từ các thành phần liên hợp không phản ứng. Như bàn luận trên, kit có thể bao gồm chất đánh dấu, ví dụ, chất đánh dấu bất kỳ được mô tả ở đây. Như bàn luận sau đây,

kit cũng bao gồm tác nhân điều trị, ví dụ, tác nhân điều trị được mô tả ở đây. Theo một số ứng dụng, kháng thể sẽ phản ứng với các thành phần khác, ví dụ, chất tạo chelat hoặc chất đánh dấu hoặc tác nhân điều trị, ví dụ, isotop phóng xạ, ví dụ, ytri hoặc luteti. Trong một số trường hợp, kit có thể bao gồm một hoặc nhiều bình phản ứng để tiến hành phản ứng hoặc thiết bị tách, ví dụ, cột sắc ký, để sử dụng trong việc tách sản phẩm cuối cùng từ nguyên liệu bắt đầu hoặc chất trung gian phản ứng.

Kit này còn có thể chứa ít nhất một thuốc thử bổ sung, như tác nhân chẩn đoán hoặc tác nhân điều trị, ví dụ, tác nhân chẩn đoán hoặc tác nhân điều trị như mô tả ở đây, và/hoặc một hoặc nhiều phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch khác, được bào chế thích hợp, trong một hoặc nhiều được phẩm riêng biệt.

Kit này còn có thể chứa một chất bảo vệ phóng xạ. Bản chất giải phóng phóng xạ của các isotop, ví dụ, $^{90}\text{Ytri}$ (^{90}Y) đã được biết. Để khắc phục sự giải phóng phóng xạ này, chất bảo vệ phóng xạ có thể được đưa vào, ví dụ, trong chất đệm phản ứng, sao cho chất bảo vệ phóng xạ này là an toàn, có nghĩa là chúng không ức chế hoặc không gây tác dụng có hại khác lên phản ứng đánh dấu, ví dụ, của isotop, như của ^{90}Y , với kháng thể. Chất đệm chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chất bảo vệ phóng xạ như albumin huyết thanh người (HAS- human serum albumin) hoặc ascorbat, chúng sẽ tối thiểu hoá sự giải phóng phóng xạ do ytri hoặc các nuclit phóng xạ mạnh khác. Các chất bảo vệ phóng xạ khác đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và cũng có thể được sử dụng trong đệm chế phẩm theo sáng chế, tức là, các chất thu dọn gốc tự do (phenol, sulfit, glutation, xystein, axit gentisic, axit nicotinic, ascorbyl palmitat, $\text{HOP}(:\text{O})\text{H}_2\text{I}$ glyxerol, natri formaldehyt sulfoxylat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, và SO_2 , v.v.).

Kit được đề xuất là kit hữu dụng để đánh dấu phóng xạ protein hoặc peptit được liên hợp với chất tạo chelat bằng isotop phóng xạ điều trị để sử dụng cho bệnh nhân. Kit này bao gồm (i) một lọ chứa kháng thể được liên hợp với chất tạo chelat, (ii) một lọ chứa đệm chế phẩm để ổn định và sử dụng kháng thể được đánh dấu phóng xạ cho bệnh nhân, và (iii) hướng dẫn để thực hiện quy trình đánh dấu phóng xạ. Kit này cung cấp sự tiếp xúc kháng thể liên hợp với chất tạo chelat với isotop phóng xạ hoặc muối của nó với lượng thời gian đủ trong các điều kiện phù hợp, ví dụ, như khuyến cáo trong hướng dẫn. Kháng thể được đánh dấu phóng xạ có độ tinh khiết đủ, hoạt tính đặc hiệu và độ đặc hiệu trong gắn kết được tạo ra. Kháng thể được đánh dấu phóng xạ có thể được pha loãng đến nồng độ thích hợp, ví dụ, trong đệm chế phẩm, và được sử

dụng trực tiếp cho bệnh nhân có hoặc không cần có sự tinh chế thêm. Kháng thể liên hợp với chất tạo chelat có thể được cung cấp ở dạng đông khô.

Sử dụng

Các phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây có ứng dụng chẩn đoán, dự đoán, điều trị và phòng bệnh *in vitro* và *in vivo*. Ví dụ, các phân tử kháng thể này có thể được sử dụng cho tế bào trong nuôi cấy, ví dụ *in vitro* hoặc *ex vivo*, hoặc được sử dụng cho đối tượng, ví dụ, *in vivo*, để điều trị, phòng bệnh, và/hoặc chẩn đoán một loạt các bệnh.

Các phân tử kháng thể, thể liên hợp miễn dịch, và protein dung hợp được mô tả ở đây có thể được sử dụng có thể điều biến hoạt tính hoặc chức năng của protein GCC, như sự gắn kết phối tử (ví dụ, sự gắn kết của ST hoặc guanylin), sự truyền tín hiệu qua GCC, duy trì dịch ruột, hiện tượng nội cân bằng điện giải, giải phóng canxi nội bào (dòng canxi), sự biệt hoá tế bào, sự tăng sinh tế bào, hoặc hoạt hoá tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp diệt, ức chế hoặc điều biến sự phát triển của, hoặc gây cản trở sự chuyển hoá của, tế bào biểu hiện GCC. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự truyền tín hiệu tế bào qua trung gian GCC hoặc phương pháp diệt tế bào. Phương pháp này có thể được sử dụng với tế bào hoặc mô bất kỳ biểu hiện GCC, như tế bào ung thư (ví dụ, tế bào từ bệnh ung thư hệ dạ dày ruột, như, ví dụ, ung thư ruột kết, dạ dày, hoặc thực quản, hoặc tế bào tụy), hoặc tổn thương ác tính. Ví dụ không giới hạn về tế bào biểu hiện GCC bao gồm tế bào ung thư tuyến ruột kết của người T84, tế bào khối u ruột kết tươi hoặc đông lạnh, và các tế bào bao gồm axit nucleic tái tổ hợp mã hoá GCC hoặc phần của nó.

Phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước tiếp xúc tế bào với phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của nó, như được mô tả ở đây, với lượng có hiệu quả, tức là, lượng đủ để ức chế sự truyền tín hiệu tế bào qua trung gian GCC hoặc lượng hiệu quả để diệt tế bào. Phương pháp có thể được sử dụng trên các tế bào nuôi cấy, ví dụ *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, hoặc *in situ*. Ví dụ, các tế bào biểu hiện GCC (ví dụ, các tế bào được thu thập bằng cách sinh thiết khối u hoặc tổn thương ác tính; các tế bào từ dòng ung thư xác định; hoặc tế bào tái tổ hợp), có thể được nuôi cấy *in vitro* trong môi trường nuôi cấy và bước tiếp xúc có thể có hiệu quả bằng cách bỏ

sung phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch vào môi trường nuôi cấy. Trong các phương pháp diệt tế bào, phương pháp bao gồm sử dụng phân tử kháng thể kháng GCC trần, hoặc thể liên hợp miễn dịch bao gồm phân tử kháng thể kháng GCC và tác nhân gây độc tế bào. Phương pháp này sẽ gây diệt tế bào biểu hiện GCC, bao gồm cụ thể các tế bào khối u biểu hiện GCC (ví dụ, tế bào khối u ruột kết).

Có thể tham khảo hướng dẫn trong bảng 7 để chọn lựa (các) kháng thể để sử dụng cho các phương pháp khác nhau. Ví dụ, bảng 7 chỉ ra kháng thể nào được xác nhận là nội hóa sau khi gắn kết GCC. Kháng thể này sẽ hữu dụng khi liên kết với gốc gây độc tế bào hoặc gốc để mô tả tế bào. Kháng thể không nội hoá có thể được sử dụng cho mục đích chẩn đoán hoặc phương pháp điều trị sử dụng kháng thể trần được thiết kế để gây đáp ứng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, hoặc có thể để dùng trong phương pháp phân phối liposom.

Phân tử kháng thể kháng GCC theo sáng chế gắn kết với các vùng ngoại bào của GCC hoặc các phần của nó trong tế bào biểu hiện kháng nguyên. Kết quả là, khi thực hành phương pháp theo sáng chế để tiêu diệt, ức chế, hoặc phát hiện các tế bào ung thư, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, gắn kết với các tế bào như vậy, không chỉ với các tế bào được cố định hoặc các tế bào mà miễn kháng nguyên nội bào của nó được tiếp xúc theo cách khác với môi trường ngoại bào. Kết quả là, sự gắn kết với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, được tập trung trong các vùng mà ở đó các tế bào biểu hiện GCC, bất chấp các tế bào được cố định hoặc không được cố định, có thể sống hoặc hoại tử. Theo cách khác hoặc bổ sung vào, các phân tử kháng thể kháng GCC, gắn kết với và được nội hoá cùng với GCC sau khi gắn kết các tế bào biểu hiện kháng nguyên.

Phương pháp này cũng có thể được thực hiện trên các tế bào có trong đối tượng, nằm trong quy trình *in vivo*. Theo một phương án, đối tượng này là đối tượng người. Theo cách khác, đối tượng này có thể là động vật có vú biểu hiện kháng nguyên GCC mà phân tử kháng thể kháng GCC bộc lộ ở đây phản ứng chéo với kháng nguyên này. Phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của nó có thể được sử dụng cho đối tượng người với mục đích điều trị. Phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch cũng có thể được sử dụng cho động vật không phải là người biểu hiện kháng nguyên giống GCC mà kháng thể sẽ phản ứng chéo với kháng nguyên này (ví dụ, động vật linh trưởng, lợn hoặc chuột) với mục đích chữa bệnh thú y hoặc là mô

hình động vật mắc bệnh của người. Các mô hình động vật có thể hữu dụng để đánh giá hiệu quả điều trị của kháng thể theo sáng chế (ví dụ, thử nghiệm liều và thời gian điều trị). Theo các phương án *in vivo*, bước tiếp xúc là có hiệu quả ở đối tượng và bao gồm việc sử dụng phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của nó cho đối tượng này trong các điều kiện có hiệu quả cho phép gắn kết cả phân tử kháng thể với miền ngoại bào của GCC biểu hiện trên tế bào, và xử lý tế bào này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch bao gồm phân tử kháng thể kháng GCC và tác nhân gây độc tế bào cho đối tượng cần được điều trị. Phương pháp này có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư bất kỳ, bao gồm ít nhất một số tế bào biểu hiện kháng nguyên GCC. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ “ung thư” có nghĩa là bao gồm tất cả các dạng phát triển ung thư hoặc các quá trình sinh khối u, các mô di căn hoặc các tế bào chuyển hóa ác tính, mô, hoặc cơ quan, bất chấp kiểu mô bệnh học hoặc giai đoạn xâm lấn. Thuật ngữ “ung thư” và “khối u” có thể sử dụng thay thế cho nhau (ví dụ, khi sử dụng trong phần nội dung liên quan đến phương pháp điều trị, “điều trị bệnh ung thư” và “điều trị khối u” có cùng nghĩa).

Theo các phương án, việc điều trị là đủ để giảm hoặc ức chế sự phát triển của khối u của đối tượng, làm giảm số lượng hoặc kích thước của tổn thương ác tính, làm giảm lượng khối u, làm giảm lượng khối u sơ cấp, làm giảm sự xâm lấn, kéo dài thời gian sống sót, hoặc duy trì hoặc cải thiện chất lượng cuộc sống.

Ví dụ về các bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khối u rắn, khối u mô mềm, và tổn thương ác tính. Ví dụ về khối u rắn bao gồm khối u ác tính, ví dụ, sarcoma, ung thư tuyến, và caxinom, của hệ thống tổ chức khác nhau, như các hệ thống ảnh hưởng đến ruột kết và tụy. Ung thư tuyến bao gồm các khối u ác tính như caxinom tế bào không nhỏ của phổi. Các tổn thương ác tính của các bệnh ung thư nêu trên cũng có thể được điều trị hoặc phòng bằng các phương pháp và được phẩm theo sáng chế. Theo một số phương án, bệnh ung thư được điều trị là bệnh ung thư ở hệ dạ dày-ruột non (ví dụ, ung thư trực tràng ruột kết, ung thư thực quản, hoặc ung thư dạ dày). Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư tụy.

Theo một phương án, bệnh ung thư là ung thư trực tràng ruột kết, ví dụ, ung thư tuyến trực tràng ruột kết, sacôm cơ trơn trực tràng ruột kết, u lympho trực tràng ruột

kết, u melanin trực tràng ruột kết, hoặc u thần kinh nội tiết trực tràng ruột kết. Theo một phương án cụ thể, bệnh ung thư là ung thư ruột kết di căn. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư dạ dày (ví dụ, ung thư tuyến, u lympho, hoặc sarcoma dạ dày), hoặc trường hợp di căn của chúng. Theo phương án khác, bệnh ung thư là bệnh ung thư thực quản (ví dụ, caxinom tế bào vảy hoặc ung thư tuyến thực quản).

Phương pháp có thể được hữu dụng để điều trị bệnh liên quan ở giai đoạn bất kỳ hoặc chưa được phân loại. Ví dụ, phương pháp này có thể được sử dụng để điều trị giai đoạn sớm hoặc muộn của bệnh ung thư ruột kết, hoặc ung thư ruột kết ở giai đoạn bất kỳ 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, và IV.

Theo một số phương án, phương pháp để điều trị bệnh ung thư (ví dụ, trực tràng ruột kết, thực quản, hoặc ung thư dạ dày) bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân cần được điều trị phân tử kháng thể kháng GCC trần được mô tả ở đây. Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm sử dụng thể liên hợp miễn dịch bao gồm phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây và tác nhân gây độc tế bào. Theo một số phương án như vậy, thể liên hợp miễn dịch được đặc trưng bởi công thức (I), như mô tả ở đây. Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch được đặc trưng bởi công thức (I-1), (I-2), (I-3), (I-4), (I-5), (I-6), hoặc (I-7) như được mô tả ở đây. Theo các phương án cụ thể, thể liên hợp miễn dịch được đặc trưng bởi công thức (I), (I-1), (I-2), (I-3), (I-4), (I-5), (I-6), hoặc (I-7), trong đó Ab biến đổi là phân tử kháng thể với các đặc điểm được tổng kết trong Bảng 1 đến 6. Theo một số phương án, Ab biến đổi là phân tử kháng thể 5F9 hoặc phân tử kháng thể Abx-229. Theo một số phương án cụ thể, thể liên hợp miễn dịch được đặc trưng bởi công thức (I-5) hoặc (I-7), trong đó Ab biến đổi là phân tử kháng thể 5F9.

Phương pháp sử dụng phân tử kháng thể và thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở trên. Các liều thích hợp của phân tử được sử dụng sẽ phụ thuộc vào độ tuổi và trọng lượng của đối tượng và hợp chất cụ thể được sử dụng.

Theo một số phương án, phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch được sử dụng trong các chu kỳ điều trị. “Chu kỳ điều trị” bao gồm giai đoạn điều trị, trong đó phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch được sử dụng như được mô tả ở trên, sau đó là giai đoạn nghỉ, trong đó không có phân tử kháng thể

kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch nào được sử dụng. Chu kỳ điều trị có thể được lặp lại nếu cần thiết để đạt được hiệu quả mong muốn.

Kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây (ví dụ, phân tử kháng thể kháng GCC trần hoặc thể liên hợp miễn dịch chứa phân tử kháng thể kháng GCC và tác nhân điều trị) có thể sử dụng kết hợp với các liệu pháp khác. Ví dụ, liệu pháp kết hợp có thể bao gồm chế phẩm theo sáng chế được bào chế đồng thời với, và/hoặc được sử dụng đồng thời với, một hoặc nhiều tác nhân điều trị bổ sung, ví dụ, một hoặc nhiều tác nhân chống ung thư, ví dụ, tác nhân gây độc tế bào hoặc kìm tế bào, điều trị hormon, vacxin, và/hoặc các liệu pháp miễn dịch khác. Theo các phương án khác, kháng thể kháng GCC được sử dụng kết hợp với các phương thức điều trị khác, bao gồm phẫu thuật, xạ trị, phẫu thuật lạnh, và/hoặc liệu pháp nhiệt. Các liệu pháp hỗn hợp này thuận lợi có thể sử dụng các liều thấp hơn của tác nhân điều trị được sử dụng, do đó tránh được độc tính có thể hoặc các biến chứng đi kèm với các liệu pháp đơn khác nhau.

Được sử dụng “kết hợp,” như được sử dụng ở đây, có nghĩa là hai (hoặc nhiều hơn) liệu pháp điều trị khác nhau được áp dụng cho đối tượng trong quá trình mắc bệnh của đối tượng, ví dụ, hai hoặc nhiều liệu pháp điều trị được áp dụng sau khi đối tượng được chẩn đoán bệnh này và trước khi bệnh này được điều trị hoặc được đẩy lùi. Theo một số phương án, một liệu pháp điều trị vẫn xảy ra khi liệu pháp điều trị thứ hai bắt đầu, sao cho có sự trùng lặp. Đôi khi thời gian này được gọi trong đây là “đồng thời” hoặc “phân phối đồng thời.” Theo các phương án khác, một liệu pháp điều trị kết thúc trước khi liệu pháp điều trị khác bắt đầu. Theo một số phương án khác, việc điều trị hiệu quả hơn do sử dụng kết hợp. Ví dụ, liệu pháp điều trị thứ hai có hiệu quả hơn, ví dụ, hiệu quả tương đương được thấy khi không có liệu pháp điều trị thứ hai, hoặc liệu pháp điều trị thứ hai làm giảm các triệu chứng với mức độ lớn hơn, so với nếu liệu pháp điều trị thứ hai được sử dụng trong khi không có liệu pháp điều trị đầu tiên, hoặc quan sát thấy tình trạng tương tự với liệu pháp điều trị thứ nhất. Theo một số phương án, việc áp dụng như vậy là sự giảm triệu chứng, hoặc các thông số khác liên quan đến bệnh là cao hơn khi quan sát với một liệu pháp điều trị đơn độc mà không có liệu pháp kia. Hiệu quả của hai liệu pháp điều trị có thể sao cho cộng từng phần, cộng hoàn toàn, hoặc cộng cao hơn. Việc áp dụng này có thể sao cho hiệu quả điều trị đầu tiên áp dụng vẫn có thể phát hiện được khi áp dụng liệu pháp điều trị thứ hai.

Theo một số phương án, phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của nó được sử dụng kết hợp với tác nhân hóa trị liệu. Các ví dụ không nhằm giới hạn về các tác nhân hoá trị liệu phá huỷ ADN bao gồm các chất ức chế topoisomeraza I (ví dụ, irinotecan, topotecan, camptothecin và chất tương tự liên quan hoặc chất chuyển hóa của chúng, và doxorubicin); chất ức chế topoisomeraza II (ví dụ, etoposid, teniposid, và daunorubicin); tác nhân alkyl hóa (ví dụ, melphalan, chlorambucil, busulfan, thiopeta, ifosfamid, carmustin, lomustin, semustin, streptozoxin, decarbazin, metotrexat, mitomycin C, và cyclophosphamid); chất lồng vào giữa ADN (ví dụ, cisplatin, oxaliplatin, và carboplatin); chất lồng vào giữa ADN và chất tạo các gốc tự do như bleomycin; và chất giống nucleosit (ví dụ, 5-fluoraxil, capecitabin, gemcitabin, fludarabin, cytarabin, mercaptopurin, thioguanin, pentostatin, và hydroxyurea).

Tác nhân hoá trị liệu làm gián đoạn sự sao chép tế bào bao gồm: paclitaxel, docetaxel, và các chất tương tự liên quan; vincristin, vinblastin, và các chất tương tự liên quan; thalidomid, lenalidomid, và các chất tương tự liên quan (ví dụ, CC-5013 và CC-4047); chất ức chế protein tyrosin kinaza (ví dụ, imatinib mesylat và gefitinib); chất ức chế proteasom (ví dụ, bortezomib); chất ức chế NF- κ B, bao gồm chất ức chế I κ B kinaza; kháng thể gắn kết với các protein biểu hiện quá mức trong bệnh ung thư và bằng cách đó điều hòa giảm sự sao chép (ví dụ, trastuzumab, rituximab, cetuximab, và bevacizumab); và các chất ức chế khác của protein hoặc enzym đã biết được điều hòa tăng, biểu hiện quá mức hoặc hoạt hóa trong các bệnh ung thư, sự ức chế chúng sẽ điều hòa giảm sự sao chép tế bào.

Việc lựa chọn (các) tác nhân điều trị hoặc phương thức điều trị được kết hợp với phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế sẽ phụ thuộc vào bệnh được điều trị. Các tác nhân hoặc phương thức điều trị bổ sung có thể bao gồm, ví dụ, các liệu pháp chuẩn đã được thông qua cho chỉ định bệnh được điều trị. Ví dụ, khi phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của nó được sử dụng để điều trị bệnh ung thư ruột kết, nó có thể được sử dụng kết hợp với, ví dụ, phẫu thuật; liệu pháp xạ trị; 5-fluorixil (5-FU), capecitabin, leucovorin, irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab, panitumum, hoặc hỗn hợp của chúng (ví dụ, oxaliplatin/capecitabin (XELOX), 5-fluorixil/leucovorin/oxaliplatin (FOLFOX), 5-fluorixil/leucovorin/irinotecan (FOLFIRI), FOLFOX và bevacizumab, hoặc FOLFIRI và bevacizumab).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch như được mô tả ở đây trong sản xuất thuốc. Theo một phương án, thuốc này để điều trị ung thư, ví dụ, ung thư dạ dày ruột non. Theo một số phương án, thuốc này bao gồm phân tử kháng thể kháng GCC có các đặc điểm được tổng hợp trong Bảng 1-6. Theo một số phương án, thuốc này bao gồm phân tử kháng thể 5F9 hoặc phân tử kháng thể Abx-229.

Kháng thể kháng GCC và thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của GCC, ví dụ, để phát hiện sự có mặt của GCC trong mẫu sinh học, hoặc để phát hiện sự có mặt hoặc phân bố GCC trong một đối tượng. Thuật ngữ “phát hiện” như được sử dụng ở đây bao gồm sự phát hiện định tính hoặc định lượng. Việc phát hiện protein GCC hoặc GCC, như được sử dụng ở đây, nghĩa là phát hiện protein GCC nguyên vẹn hoặc phát hiện phần protein GCC bao gồm epitop mà phân tử kháng thể kháng GCC gắn vào.

Theo đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập, phương pháp phát hiện protein GCC, ví dụ, phát hiện tế bào hoặc mô biểu hiện GCC, ví dụ, tế bào khối u, hoặc khối u có các tế bào biểu hiện GCC. Phương pháp này bao gồm: cho nguyên liệu, ví dụ, tế bào hoặc mô, ví dụ, mẫu của khối u biểu hiện GCC, tiếp xúc với phân tử kháng thể kháng GCC, ví dụ, phân tử kháng thể kháng GCC được mô tả ở đây, trong các điều kiện cho phép hình thành phức giữa phân tử kháng thể kháng GCC và protein GCC; và phát hiện sự hình thành phức giữa phân tử kháng thể và protein GCC, bằng cách đó phát hiện sự có mặt của protein GCC, ví dụ, để phát hiện ra tế bào hoặc khối u biểu hiện GCC.

Theo một phương án, phân tử kháng thể kháng GCC là thể liên hợp miễn dịch bao gồm chất đánh dấu có thể phát hiện.

Theo một số phương án, các mô bao gồm mô bình thường và/hoặc mô ung thư biểu hiện GCC ở các mức cao hơn tương ứng với các mô khác, ví dụ mô khác như tế bào B và/hoặc mô liên quan đến tế bào B.

Các phương pháp phát hiện được mô tả ở đây, hoặc *in vitro* hoặc *in vivo*, có thể được sử dụng để đánh giá một đối tượng. Theo một phương án, phương pháp này được thực hiện *in vivo*, và có thể được sử dụng, ví dụ, để chụp ảnh, xác định giai đoạn, đánh

giá hoặc chẩn đoán bệnh nhân. Theo một số phương án, bệnh này là bệnh tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư hoặc khối u, ví dụ, ung thư ruột kết.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất, phương pháp để phát hiện sự có mặt protein GCC *in vitro* (ví dụ, trong mẫu sinh học, như mô sinh thiết, ví dụ, từ mô khối u, từ một đối tượng) hoặc *in vivo* (ví dụ, bằng cách chụp ảnh *in vivo* trong đối tượng). Phương pháp này bao gồm: (i) cho tiếp xúc mẫu với phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của chúng, hoặc sử dụng cho đối tượng, phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của nó; và (ii) phát hiện sự hình thành của phức giữa phân tử kháng thể kháng GCC và protein GCC. Sự hình thành phức là chỉ thị cho sự có mặt hoặc mức GCC.

Theo các phương án, mức của phức được phát hiện trong mẫu hoặc đối tượng được so sánh với giá trị tham chiếu, ví dụ, giá trị về sự hình thành phức hoặc mức GCC. Theo một phương án, mức GCC vượt quá giá trị tham chiếu là chỉ thị cho rối loạn qua trung gian GCC.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm cho mẫu đối chiếu, ví dụ, mẫu đối chứng (ví dụ, mẫu sinh học đối chứng, như huyết tương, mô, sinh thiết) hoặc đối tượng đối chứng) tiếp xúc với phân tử kháng thể kháng GCC hoặc thể liên hợp miễn dịch của nó và so sánh mức phức được phát hiện trong đó với mức phát hiện trong mẫu hoặc đối tượng.

Theo một số phương án, tế bào hoặc mô thử nghiệm được thu lấy từ một cá thể nghi ngờ là mắc bệnh có liên quan đến sự biểu hiện GCC tăng.

Theo một phương án, mức GCC, trong một mẫu từ đối tượng, hoặc trong đối tượng, được so sánh với mức tham chiếu, ví dụ, mức GCC trong nguyên liệu đối chứng, ví dụ, tế bào bình thường của cùng nguồn mô là tế bào của đối tượng hoặc tế bào có GCC ở các mức so sánh được với tế bào bình thường như vậy. Phương pháp này có thể bao gồm, ví dụ, đáp ứng với mức phát hiện của GCC, chẩn đoán, tiên lượng, đánh giá hiệu quả điều trị, hoặc xác định giai đoạn rối loạn. Mức cao hơn của GCC trong mẫu hoặc đối tượng, khi so với nguyên liệu đối chứng, chỉ thị sự có mặt của rối loạn liên quan đến sự biểu hiện GCC. Mức cao hơn của GCC trong mẫu hoặc đối tượng này, khi so với nguyên liệu đối chứng, cũng có thể chỉ thị, sự thiếu tương đối hiệu quả điều trị, tiên lượng tình trạng xấu hơn, hoặc các giai đoạn muộn của bệnh.

Mức GCC cũng có thể được sử dụng để đánh giá hoặc lựa chọn việc điều trị tương lai, ví dụ, nhu cầu điều trị tấn công mạnh hơn hoặc ít hơn, hoặc nhu cầu chuyển từ chế độ điều trị này sang chế độ khác.

Mức GCC cũng có thể được sử dụng để chọn hoặc đánh giá bệnh nhân. Ví dụ, theo các phương án, bệnh nhân mà tế bào khối u của họ biểu hiện lượng cao GCC trên bề mặt của chúng sẽ được xem xét là một đối tượng sẵn sàng để điều trị bằng các phân tử kháng thể kháng GCC liên hợp với độc tố. Theo các phương án, bệnh nhân có tế bào khối u biểu hiện các lượng thấp GCC trên bề mặt của chúng sẽ không phải là đối tượng cần được điều trị hoặc có thể là các đối tượng để kết hợp phân tử kháng thể kháng GCC với phương pháp điều trị điều trị bổ sung, hoặc là đối tượng cho liệu pháp kháng thể trần. Trong ví dụ khác, liều phân tử kháng thể kháng GCC liên hợp với độc tố có thể được điều chỉnh để phản ánh số lượng phân tử GCC được biểu hiện trên bề mặt của tế bào khối u. Bệnh nhân với số lượng phân tử GCC cao trên bề mặt tế bào khối u có thể được điều trị với các liều thấp hơn so với các bệnh nhân có số phân tử GCC thấp. Việc phát hiện sự có mặt của tế bào khối u biểu hiện GCC *in vivo* có thể cho phép xác định mô trong khối u biểu hiện GCC sơ cấp đã di căn. Việc hiểu rằng các mô này đã di căn có thể quyết định đến việc sử dụng tại đích của liệu pháp khối u hay không.

Như được bàn luận ở trên, các phân tử kháng thể được mô tả ở đây cho phép đánh giá sự có mặt của protein GCC trong các mô mới hình thành so với bình thường, thông qua đó mà sự có mặt hoặc mức độ nặng của bệnh, tiến trình bệnh và/hoặc hiệu quả của liệu pháp điều trị có thể được đánh giá. Ví dụ, liệu pháp có thể được kiểm soát và đánh giá hiệu quả. Trong một ví dụ, protein GCC có thể được phát hiện và/hoặc định lượng trong mẫu đầu tiên thu được từ đối tượng mắc bệnh miễn dịch và liệu pháp có thể được bắt đầu. Sau đó, mẫu thứ hai có thể thu được từ đối tượng và protein GCC trong mẫu có thể được phát hiện và/hoặc định lượng. Sự giảm định lượng của protein GCC được phát hiện hoặc đánh giá trong mẫu thứ hai có thể là chỉ thị cho hiệu quả điều trị.

Các bệnh tăng sinh tế bào ví dụ có thể được đánh giá, ví dụ, được chẩn đoán, bằng kháng thể được bộc lộ ở đây bao gồm rối loạn tăng sinh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư ruột kết, ung thư dạ dày, ung thư thực quản.

Theo một số phương án, phương pháp, như các phương pháp được mô tả ở trên, bao gồm phát hiện sự gắn kết của kháng thể kháng GCC với GCC được biểu hiện trên bề mặt của tế bào hoặc trong chế phẩm màng thu được từ tế bào biểu hiện GCC trên bề mặt của nó. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với kháng thể kháng GCC trong các điều kiện cho phép sự gắn kết của kháng thể kháng GCC với GCC, và phát hiện liệu có hình thành phức giữa kháng thể kháng GCC và GCC trên bề mặt tế bào. Thử nghiệm ví dụ để phát hiện sự gắn kết của kháng thể kháng GCC với GCC được biểu hiện trên bề mặt của tế bào là thử nghiệm “FACS”.

Các mẫu ví dụ cho phương pháp được mô tả ở đây bao gồm mô hoặc dịch thể, như dịch rò tại chỗ viêm, máu, huyết thanh, dịch ruột, mẫu phân, hoặc sinh thiết. Trong một ví dụ, mẫu (*ví dụ*, mô và/hoặc dịch thể) có thể thu được từ cá thể và phương pháp miễn dịch thích hợp có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc định lượng sự biểu hiện protein GCC. Các phương pháp miễn dịch thích hợp để phát hiện hoặc định lượng sự biểu hiện protein GCC bao gồm thử nghiệm hấp thu miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, mô miễn dịch học, đếm tế bào theo dòng, và tương tự.

Các phân tử kháng thể kháng GCC được sử dụng trong các phương pháp được mô tả ở đây, ví dụ, trong việc phát hiện *in vivo* và *in vitro*, ví dụ, phương pháp chẩn đoán, xác định giai đoạn, hoặc phương pháp chụp ảnh, có thể được đánh dấu trực tiếp hoặc gián tiếp bằng một cơ chất có thể phát hiện để thúc đẩy phát hiện của tác nhân gắn kết hoặc chưa gắn kết. Cơ chất có thể phát hiện thích hợp bao gồm các enzym hoạt động sinh học khác nhau, phospho, các nhóm giả, nguyên liệu huỳnh quang, nguyên liệu phát quang, nguyên liệu hóa học phát quang, nguyên liệu sinh học huỳnh quang, nguyên liệu mang màu, nguyên liệu giàu electron, chất thuận từ (ví dụ, hoạt tính hấp thụ từ hạt nhân), và các nguyên liệu hoạt động phóng xạ. Theo một số phương án, phân tử kháng thể kháng GCC được kết hợp với ion hoạt động phóng xạ, ví dụ, indium (^{111}In), iot (^{131}I hoặc ^{125}I), ytri (^{90}Y), luteti (^{177}Lu), actini (^{225}Ac), bismuth (^{212}Bi hoặc ^{213}Bi), lưu huỳnh (^{35}S), cacbon (^{14}C), triti (^3H), rođi (^{188}Rh), tecneti ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), praseodymi, hoặc phospho (^{32}P); hoặc nuclit phóng xạ phát positron, ví dụ, cacbon-11 (^{11}C), kali-40 (^{40}K), nitơ-13 (^{13}N), oxy-15 (^{15}O), Flo-18 (^{18}F), và iot-121 (^{121}I).

Chất đánh dấu ví dụ bao gồm nhóm huỳnh quang như các chelat đất hiếm hoặc florescein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon,

luciferaza, ví dụ, luciferaza của đom đóm và luciferaza của vi khuẩn (Patent Mỹ số 4.737.456), luciferin, và 2,3-dihydrophthalazindion. Các chất đánh dấu ví dụ khác bao gồm peroxidaza cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, oxidaza sacarit, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza 6-phosphat dehydroaza, oxidaza dị vòng như uricaza và xanthin oxidaza, kết hợp với enzym sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, chất đánh dấu quay cực, chất đánh dấu thể thực khuẩn, các gốc tự do thích hợp, và tương tự.

Các phân tử kháng thể được đánh dấu bằng nhóm huỳnh quang và nhóm mang màu có thể được điều chế từ các gốc chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Do kháng thể và các protein khác hấp thụ ánh sáng có bước sóng lên đến khoảng 310nm, các gốc huỳnh quang sẽ được chọn để có độ hấp thụ về cơ bản ở bước sóng trên 310nm và tốt hơn là trên 400nm. Một loạt các hợp chất huỳnh quang thích hợp và nhóm mang màu được mô tả trong Stryer *Science*, 162:526 (1968) và Brand, L. et al. *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868 (1972). Kháng thể có thể được đánh dấu bằng nhóm mang màu huỳnh quang bằng các quy trình thông thường như được mô tả trong Patent Mỹ số 3.940.475, 4.289.747, và 4.376.110.

Một nhóm phát huỳnh quang có một số đặc điểm mong muốn như được mô tả ở trên là thuốc nhuộm xanthen, bao gồm các floresxein có nguồn gốc từ 3,6-dihydroxy-9-phenylxanthhydrol và resamin và rhodamin có nguồn gốc từ 3,6-diamino-9-phenylxanthhydrol và lisanin rhodamin B. Các dẫn xuất rhodamin và floresxein của 9-o-carboxyphenylxanthhydrol có nhóm 9-o-carboxyphenyl. Các hợp chất floresxein có các nhóm kết hợp phản ứng như nhóm amino và isothioxyanat như floresxein isothioxyanat và florescamin là có sẵn. Nhóm các hợp chất huỳnh quang khác là naphtylamins, có nhóm amin ở vị trí α hoặc β .

Phân tử kháng thể đã đánh dấu có thể được sử dụng, ví dụ, trong chẩn đoán và/hoặc thực nghiệm trong một số nội dung, bao gồm (i) để tách kháng nguyên đã biết bằng các kỹ thuật chuẩn, như sắc ký ái lực hoặc kết tủa miễn dịch; (ii) để phát hiện kháng nguyên đã biết (ví dụ, trong dịch phân giải tế bào hoặc dịch tế bào) để đánh giá sự dư và mô hình biểu hiện protein; (iii) để kiểm tra mức protein trong mô là một phần

của quy trình thử nghiệm lâm sàng, ví dụ, để xác định hiệu quả của chế độ điều trị đưa ra.

Một số phương pháp khác có thể được sử dụng để xác định sự gắn kết của kháng thể kháng GCC với GCC. Các phương pháp như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thử nghiệm gắn kết kháng nguyên đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như thẩm tách protein, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm hấp thu miễn dịch liên kết enzym (ELISA - enzym linked immunosorbent assay), thử nghiệm miễn dịch “sandwich”, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch protein A, và mô hóa học miễn dịch (IHC-immunohistochemistry).

Sự tạo phức giữa phân tử kháng thể kháng GCC và GCC có thể được phát hiện bằng cách đo hoặc gây hiển thị kháng thể (hoặc mảnh kháng thể) gắn kết với kháng nguyên GCC hoặc phân tử kháng thể không gắn kết. Các thử nghiệm phát hiện thông thường có thể được sử dụng, ví dụ, thẩm tách protein, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, ELISA, thử nghiệm miễn dịch “sandwich”, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch protein A, và hóa học mô miễn dịch (IHC) hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA).

Thay thế cho việc đánh dấu phân tử kháng thể kháng GCC, sự có mặt của GCC có thể được thử nghiệm trong mẫu bằng thử nghiệm miễn dịch cạnh tranh sử dụng các chất chuẩn đánh dấu bằng cơ chất có thể phát hiện và phân tử kháng thể kháng GCC không đánh dấu. Trong thử nghiệm này, mẫu sinh học, chất chuẩn đánh dấu và tác nhân gắn kết GCC được kết hợp và lượng chất chuẩn được đánh dấu gắn kết với kháng thể chưa đánh dấu được xác định. Lượng GCC trong mẫu này tỷ lệ nghịch với lượng chất chuẩn đánh dấu gắn kết với tác nhân gắn kết GCC.

Cũng có thể phát hiện trực tiếp GCC với sự tạo phức phân tử kháng thể kháng GCC mà không cần thao tác nào khác hoặc đánh dấu thành phần khác (GCC hoặc phân tử kháng thể), ví dụ bằng cách sử dụng kỹ thuật truyền năng lượng huỳnh quang (FET, xem, ví dụ, Lakowicz *et al.*, Patent Mỹ số 5.631.169; Stavrianopoulos, *et al.*, Patent Mỹ số 4.868.103). Chất đánh dấu mang huỳnh quang đầu tiên, phân tử ‘chất cho’ được lựa chọn sao cho, khi kích thích bằng ánh sáng tới với bước sóng thích hợp, năng lượng huỳnh quang phát ra của nó sẽ được hấp thu bởi chất đánh dấu huỳnh quang trên phân tử ‘nhận’ thứ hai, phân tử này lần lượt có thể phát huỳnh quang do

năng lượng hấp thu. Theo cách khác, phân tử protein ‘cho’ có thể sử dụng một cách đơn giản năng lượng huỳnh quang tự nhiên của gốc tryptophan. Các chất đánh dấu được chọn phát ra các bước sóng ánh sáng khác nhau, sao cho phân tử đánh dấu ‘nhận’ có thể phân biệt với ‘chất cho’. Do hiệu lực truyền năng lượng giữa các chất đánh dấu là có liên quan đến khoảng cách giữa các phân tử, mối quan hệ không gian giữa các phân tử có thể được đánh giá. Trong trường hợp trong đó sự gắn kết xảy ra giữa các phân tử, sự phát huỳnh quang của phân tử chất đánh dấu ‘nhận’ trong thử nghiệm này sẽ là tối đa. Sự gắn kết FET có thể được đo một cách thuận tiện qua phương pháp phát hiện huỳnh quang chuẩn đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, bằng huỳnh quang kế).

Theo ví dụ khác, việc xác định khả năng của phân tử kháng thể nhận diện GCC có thể được thực hiện mà không cần cần đánh dấu thành phần thử nghiệm (hoặc GCC hoặc phân tử kháng thể) bằng cách sử dụng kỹ thuật như Phân tích tương tác sinh học phân tử thời gian thực (BIA - real-time Biomolecular Interaction Analysis) (xem, ví dụ, Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345 and Szabo *et al.*, 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). Như được sử dụng ở đây, “BIA” hoặc “độ cộng hưởng plasmon bề mặt” là một kỹ thuật nghiên cứu tương tác đặc hiệu sinh học về thời gian thực, mà không cần đánh dấu chất tương tác bất kỳ (ví dụ, BIACORE™). Sự thay đổi về khối lượng ở bề mặt gắn kết (chỉ thị cho sự gắn kết) gây ra sự biến đổi về hệ số khúc xạ của ánh sáng gần bề mặt (hiện tượng quang học của cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)), tạo ra một tín hiệu có thể phát hiện có thể được sử dụng là chỉ thị của tương tác thời gian thực giữa các phân tử sinh học.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập phương pháp để phát hiện sự có mặt của mô khối u biểu hiện GCC *in vivo*. Phương pháp này bao gồm (i) sử dụng cho đối tượng (ví dụ, bệnh nhân mắc ung thư) kháng thể kháng GCC hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, tốt hơn là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được liên hợp với chất đánh dấu có thể phát hiện; (ii) cho tiếp xúc đối tượng này với phương tiện để phát hiện chất đánh dấu có thể phát hiện nêu trên với mô hoặc tế bào biểu hiện GCC.

Ví dụ về các chất đánh dấu hữu dụng để chụp ảnh chẩn đoán phù hợp với sáng chế là chất đánh dấu phóng xạ như ^{131}I , ^{111}In , ^{68}Ga , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C , và ^{188}Rh , chất đánh dấu huỳnh quang như florescein và rhodamin, chất đánh dấu hoạt

động cộng hưởng từ hạt nhân, isotop phát positron có thể phát hiện bằng thiết bị chụp cắt lớp phát xạ photon đơn bằng máy tính (single photon emission computed tomography - SPECT) hoặc thiết bị quét chụp cắt lớp phát xạ positron ("PET-positron emission tomography"), chất phát quang hóa học như luciferin, và chất đánh dấu enzym như peroxidaza hoặc phosphataza. Nguồn bức xạ phóng xạ khoảng bước sóng ngắn, như isotop có thể phát hiện bằng các đoạn mồi phát hiện khoảng bước sóng ngắn, như mồi qua trực tràng, cũng có thể được sử dụng. Kháng thể có thể được đánh dấu bằng các thuốc thử như vậy bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem Wensel và Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York, đối với các kỹ thuật liên quan đến đánh dấu phóng xạ kháng thể. Cũng xem, D. Colcher et al. *Meth. Enzymol.* 121: 802-816 (1986).

Trong trường hợp kháng thể được đánh dấu phóng xạ, kháng thể được sử dụng cho bệnh nhân, được định vị đến khối u mang kháng nguyên mà kháng thể sẽ phản ứng với nó, và được phát hiện hoặc "chụp ảnh" *in vivo* bằng các kỹ thuật đã biết như quét phóng xạ hạt nhân bằng ví dụ, máy chụp tia gama hoặc chụp cắt lớp phát xạ hoặc chụp cắt lớp vi tính. Xem ví dụ, A.R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al., (eds.), pp 65-85 (Academic Press 1985). Theo cách khác, máy quét chụp cắt lớp xuyên trực phát positron, như được ký hiệu là Pet VI đặt tại phòng thí nghiệm quốc gia Brookhaven, có thể được sử dụng trong đó chất đánh dấu phóng xạ phát positron (ví dụ, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , và ^{13}N).

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các phương pháp để xác định liều, ví dụ, liều phóng xạ, mà các mô khác nhau được tiếp xúc với liều này khi một đối tượng, ví dụ, đối tượng người, được sử dụng phân tử kháng thể kháng GCC liên hợp với isotop hoạt động phóng xạ. Phương pháp này bao gồm: (i) sử dụng phân tử kháng thể kháng GCC như được mô tả ở đây, ví dụ, phân tử kháng thể kháng GCC, được đánh dấu bằng isotop hoạt động phóng xạ cho đối tượng; (ii) đo lượng isotop hoạt động phóng xạ nằm trong các mô khác nhau, ví dụ, khối u, hoặc máu, ở các thời điểm khác nhau cho đến khi một số hoặc tất cả các isotop hoạt động phóng xạ được loại hết khỏi cơ thể của đối tượng; và (iii) tính liều tổng cộng phóng xạ nhận được bởi mỗi mô phân tích. Phép đo này có thể được diễn ra ở các thời điểm đã đặt lịch, ví dụ, ngày 1, 2,

3, 5, 7, và 12, sau đó sử dụng (vào ngày 0) phân tử kháng thể kháng GCC được đánh dấu phóng xạ cho đối tượng. Nồng độ của isotop phóng xạ có trong mô được nêu, kết hợp theo thời gian, và nhân với hoạt tính riêng của isotop phóng xạ có thể được sử dụng tính liều mà mô cụ thể nhận được. Thông tin dược lý có được bằng cách sử dụng phân tử kháng thể kháng GCC được đánh dấu bằng một isotop hoạt động phóng xạ, ví dụ, nguồn bức xạ gama, ví dụ, ^{111}In , có thể được sử dụng để tính liều mong đợi mà cùng loại mô đó sẽ nhận được từ isotop hoạt động phóng xạ khác không thể đo được dễ dàng, ví dụ, nguồn bức xạ beta, ví dụ, ^{90}Y .

Các trình tự kháng thể kháng GCC

Kháng thể kháng GCC được sinh ra bằng nhiều phương pháp, như được bàn luận chi tiết trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Ngắn gọn, kháng thể đơn dòng 3G1 8F1 và 10B8 của chuột được sinh ra bằng kỹ thuật gây miễn dịch truyền thống ở chuột bình thường. Kháng thể đơn dòng 1D2, 5F9, 5H3, 6H8, 8C2, và 10C10 của người được sinh ra bằng cách sử dụng chuột biến đổi gen sẽ sinh ra kháng thể IgG2 của người đầy đủ, sử dụng kỹ thuật biến đổi gen Abgenix XENOMOUSE, và phân tách bằng kỹ thuật lai. mAb Abx-012, mAb Abx-020, mAb Abx-106, mAb Abx-198, mAb Abx-221, mAb Abx-229, mAb Abx-338 và mAb Abx-393 của người được sinh ra bằng cách sử dụng chuột biến đổi gen sẽ sinh ra kháng thể IgG2 người đầy đủ. Kháng thể đơn được phân tách bằng kỹ thuật Abgenix SLAM. Chúng được sử dụng để tạo ra kháng thể IgG1 của người đầy đủ. Tính đặc hiệu của kháng thể kháng GCC được kiểm tra bằng ELISA và đếm tế bào theo dòng (FCM). Tập hợp con của các kháng thể sinh ra được chọn để xác định đặc điểm tiếp.

Bảng 1 sau đây tổng kết về một số thiết kế kháng thể kháng GCC, yếu tố sinh miễn dịch được sử dụng để sinh kháng thể, động vật được sử dụng, nguồn, loài và các thể phân lập isotyp.

Bảng 1

<u>Ab</u>	<u>Yếu tố sinh miễn dịch</u>	<u>Động vật</u>	<u>Nguồn</u>	<u>Loài</u>	<u>Isotyp</u>
3G1	TOK107-hIg	Chuột thông thường C57	Thể lai	Chuột	IgG1,k
8F1	TOK107-hIg	Chuột thông thường C57	Thể lai	Chuột	IgG1,k
10B8	TOK107-hIg	Chuột thông thường C57	Thể lai	Chuột	IgG1,k
1D3	TOK107-hIg	Chuột thông thường C57	Thể lai	Chuột	IgG1,k
8E12	TOK107-hIg	Chuột thông thường C57	Thể lai	Chuột	IgG1,k

5F9	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	Thể lai	Người	IgG2,k
1D2	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	Thể lai	Người	IgG2,k
5H3	Tế bào CHO-GC-C#27	Chuột cấy ghép ngoại lai	Thể lai	Người	IgG2,k
6H8	Tế bào CHO-GC-C#27	Chuột cấy ghép ngoại lai	Thể lai	Người	IgG2,k
8C2	Tế bào CHO-GC-C#27	Chuột cấy ghép ngoại lai	Thể lai	Người	IgG2,k
10C10	Tế bào CHO-GC-C#27	Chuột cấy ghép ngoại lai	Thể lai	Người	IgG2,k
10D3	Tế bào CHO-GC-C#27	Chuột cấy ghép ngoại lai	Thể lai	Người	IgG2,k
1C9	Tế bào CHO-GC-C#27	Chuột cấy ghép ngoại lai	Thể lai	Người	IgG2,k
229	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	SLAM	Người	IgG1,k
012	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	SLAM	Người	IgG1,k
221	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	SLAM	Người	IgG1,k
020	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	SLAM	Người	IgG1,k
338	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	SLAM	Người	IgG1,k
106	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	SLAM	Người	IgG1,k
198	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	SLAM	Người	IgG1,k
393	TOK107-hIg	Chuột cấy ghép ngoại lai	SLAM	Người	IgG1,k

Các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định. Bảng 2 sau đây tóm tắt về các SEQ ID NO đối với các vùng biến đổi của nhiều kháng thể. Các trình tự axit amin và axit nucleic đối với các vùng biến đổi của mỗi chuỗi trong số chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng GCC của chuột và người lần lượt được trình bày trong Bảng 3 và 4.

Trình tự axit amin và axit nucleic của mỗi CDR chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đối với kháng thể kháng GCC lần lượt được trình bày trong Bảng 5 và 6.

Ví dụ, Bảng 3, dòng 9 minh họa trình tự axit amin được mã hóa của vùng biến đổi chuỗi nặng thành thực của mAb 5F9 (SEQ ID NO:18); và trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng thành thực của mAb 5F9 (SEQ ID NO:17) được mô tả trong Bảng 4, dòng 9. Các trình tự axit amin được mã hóa của CDR (CDR) 1 (SEQ ID NO:106), CDR2 (SEQ ID NO:108) và CDR3 (SEQ ID NO:110) của chuỗi nặng mAb 5F9 (lần lượt được thể hiện trong Bảng 5, dòng 25-27; và trình tự axit nucleic của CDR1 (SEQ ID NO:105), CDR2 (SEQ ID NO:107) và CDR3 (SEQ ID NO:109) của chuỗi nặng mAb 5F9 lần lượt được thể hiện trong Bảng 6, dòng 25-27.

Bảng 3, dòng 10 minh họa trình tự axit amin được mã hóa của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thành thực của mAb 5F9 (SEQ ID NO:20); và trình tự axit nucleic mã

hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kapa thành thực của mAb 5F9 (SEQ ID NO:19) được mô tả trong Bảng 4, dòng 10. Các trình tự axit amin được mã hóa của CDR (CDR) 1 (SEQ ID NO:112), CDR2 (SEQ ID NO:114) và CDR3 (SEQ ID NO:116) của chuỗi nhẹ mAb 5F9 lần lượt được thể hiện trong Bảng 5, dòng 28-30; và trình tự axit nucleic của CDR1 (SEQ ID NO:111), CDR2 (SEQ ID NO:113) và CDR3 (SEQ ID NO:115) của chuỗi nhẹ mAb 5F9 lần lượt được thể hiện trong Bảng 6, dòng 28-30.

Việc xác định trình tự của các CDR cho phép xác định sự dư các gốc có thể đóng vai trò là vị trí tiếp hợp với độc tố. Xystein tự do chưa kết đôi trong vùng gắn kết kháng nguyên có thể là vị trí để liên hợp auristatin và lysin có thể là vị trí để liên hợp maytansin. Sự liên hợp của độc tố với một axit amin của CDR sẽ thúc đẩy mối quan tâm cần thay đổi ái lực gắn kết của kháng thể với GCC. Do đó, theo các phương án, các CDR thiếu một axit amin có thể được liên hợp với tác nhân điều trị.

Bảng 2. Tóm tắt về các SEQ ID NO của các vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng.

mAb	Chuỗi IgG	NA SEQ ID	AA SEQ ID
3G1	Chuỗi nặng	1	2
	Chuỗi nhẹ	3	4
8E12	Chuỗi nặng	5	6
	Chuỗi nhẹ	7	8
8F1	Chuỗi nặng	9	10
	Chuỗi nhẹ	11	12
1D3	Chuỗi nặng	13	14
	Chuỗi nhẹ	15	16
5F9	Chuỗi nặng	17	18
	Chuỗi nhẹ	19	20
5H3	Chuỗi nặng	21	22
	Chuỗi nhẹ	23	24
6H8	Chuỗi nặng	25	26
	Chuỗi nhẹ	27	28
8C2	Chuỗi nặng	29	30
	Chuỗi nhẹ	31	32
10C10	Chuỗi nặng	33	34
	Chuỗi nhẹ	35	36
10D3	Chuỗi nặng	286	287

	Chuỗi nhẹ	288	289
Abx-012	Chuỗi nặng	238	239
	Chuỗi nhẹ	240	241
Abx-020	Chuỗi nặng	37	38
	Chuỗi nhẹ	39	40
Abx-106	Chuỗi nặng	242	243
	Chuỗi nhẹ	244	245
Abx-198	Chuỗi nặng	41	42
	Chuỗi nhẹ	43	44
Abx-221	Chuỗi nặng	246	247
	Chuỗi nhẹ	248	249
Abx-229	Chuỗi nặng	45	46
	Chuỗi nhẹ	47	48
Abx-338	Chuỗi nặng	49	50
	Chuỗi nhẹ	51	52
Abx-393	Chuỗi nặng	53	54
	Chuỗi nhẹ	55	56

Bảng 3. Trình tự axit amin của vùng biến đổi của mAb

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
1	3G1	Chuỗi nặng	2	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSRNAISWV RQPPGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSALKSRLSIRKEN SKSQVFLKMNSLQTEDTARYFCARSGYDGF Y WGQ GTLVTVSA
2	3G1	Chuỗi nhẹ	4	QIVLTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVNYMHWYQ QKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLT ITSMEAEDAATYYCQQWSGNPYTFGGGTKLEIK
3	8E12	Chuỗi nặng	6	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINW VKQRPQGQGLEWIGKIGPRSGNTYYNEKFKGKATLTA DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGT LTVS
4	8E12	Chuỗi nhẹ	8	DVVMQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTY LNWLQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSE TDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGTYYPYTFGGGTKL EIK
5	8F1	Chuỗi nặng	10	QVQLQQPGAELVKPGASVQMCKASGYIFTGYWM YWVKQRPQGQGLEWIGRIHPSDSNTNYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTHALAYWG QGTLVTVS

6	8F1	Chuỗi nhẹ	12	DVVLQTPLTLSITIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYL SWLLQRPQGQSPKRLIYLVSQLDSGVPDRFTGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVIYCYVQGTHLFTFGSGTKLEIK
7	1D3	Chuỗi nặng	14	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYIN WVKQRPQGQGLEWIGKIGPRSGSTYYNEKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWQG GTLVTVSA
8	1D3	Chuỗi nhẹ	16	DVVMQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTY LNWLQRPQGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSE TDFTLKISRVEAEDLGVIYCLQGTYYPYTFGGGTKL EIK
9	5F9	Chuỗi nặng	18	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRVTISVD TSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFD HWGQGTLTVSS
10	5F9	Chuỗi nhẹ	20	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL TIGSLQSEDAVYYCQQYKTPWPTFGQGTNVEIK
11	5H3	Chuỗi nặng	22	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDCYMS WIRQSPGKGLEWVSYITTSNGTIYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGWFG MDVWGQGTITVTVSS
12	5H3	Chuỗi nhẹ	24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHNDGKTY LYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVDPDRFSSSGSXT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPRTFGQGTKVEI K
13	6H8	Chuỗi nặng	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAIWDGSGSNKYAADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYF DYWGQGTLVTVSS
14	6H8	Chuỗi nhẹ	28	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTY LSWLQRPQGQPPRLLIYKTSNRFSGVDPDRFSGSGAGT DFTLKISRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEI K
15	8C2	Chuỗi nặng	30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVGAIWDGSGSNKYAASVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVFYCARGRSSSYF DYWGQGTLVTVSS
16	8C2	Chuỗi nhẹ	32	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTY LSWLQRPQGQPPRLLIYKTSNRFSGVDPDRFSGSGAGT DFTLKISRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEI K
17	10C10	Chuỗi nặng	34	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAIWDGSGSNKYAADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYF DYWGQGTLVTVSS

18	10C10	Chuỗi nhẹ	36	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASFSCRSSQSLVHSDGNTY LSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEI K
35	10D3	Chuỗi nặng	287	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKS VTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYT YGNFDHWGQGTLLTVSS
36	10D3	Chuỗi nhẹ	289	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGTPDRFSGSGSGTDFTL TISRLE PEDFAVYFCQQYERSFTFGPGTKVD
19	Abx-012	Chuỗi nặng	239	QVQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWI RQPAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVSVSDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGG GTLTVSS
20	Abx-012	Chuỗi nhẹ	241	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRAAGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGKVEIK
21	Abx-020	Chuỗi nặng	38	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWISYITSSGSTIYYASVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGFWGFWH FDYWGGQGTLLTVSS
22	Abx-020	Chuỗi nhẹ	40	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTY LYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPNRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLTWTFGQGTKV EIK
23	Abx-106	Chuỗi nặng	243	QVQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWI RQPAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVSVSDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGG GTLTVSS
24	Abx-106	Chuỗi nhẹ	245	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPMCSFGQGTKLEIK
25	Abx-198	Chuỗi nặng	42	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSW VRQAPGKGLDWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMHSLSAEDTAIYYCAKRRWQGYFDL WGRGTLTVSS
26	Abx-198	Chuỗi nhẹ	44	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRARQRVDSRYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGKVEIK
27	Abx-221	Chuỗi nặng	247	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMN WVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSG PFDYWGGQGTLLTVSS

28	Abx-221	Chuỗi nhẹ	249	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRSLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDVAVYYCQQYNNWMCSFGQGKLEIK
29	Abx-229	Chuỗi nặng	46	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMN WVRQAPGKGLEWVSGISGSGGRITYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSG PFDYWGQGTLLTVSS
30	Abx-229	Chuỗi nhẹ	48	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYCHQYSNWMCSFGQGKLEIK
31	Abx-338	Chuỗi nặng	50	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYWWSWI RQPAGKGLEWIGRIYISGRITTFNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYFCARDRYGYLDYWGQ GTLTVTVSS
32	Abx-338	Chuỗi nhẹ	52	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRSLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPSTFGQGTREIK
33	Abx-393	Chuỗi nặng	54	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRHYWWSW IRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNLSLKSRTISRDTIS KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAAGMGFDYWGQGT LTVTVSS
34	Abx-393	Chuỗi nhẹ	56	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQAIRNDLGWYQ LKPAGKAPKRLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDSATYYCLQHNSFPPTFGQGTKEIK

Bảng 4. Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi mAb

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit nucleic
1	3G1	Chuỗi nặng	1	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGG TGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACT GTCTCTGGGTTCTCATTAAGCAGAAATGCTATAAG CTGGGTTCCGCCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGT GGCTTGAGTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAA TTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCC GCAAAGAGAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAA ATGAACAGTCTACAACTGAAGACACAGCCAGGT ACTTCTGTGCCAGAAAGTGGTTACGACGGGTTTGAT TACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGC A

2	3G1	Chuỗi nhẹ	3	CAGATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCA GTGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGCACTGGTAC CAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGA TTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTA CTCTCTCACAATCACCAGCATGGAGGCTGAAGATG CTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTAAC CCGTACACGTTCTGGAGGGGGGACCAAAGTGGAAA TAAAA
3	8E12	Chuỗi nặng	5	CAGGTCCAGTTGAAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGG CTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACTATATAAACT GGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTG GATTGGAAAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTT ACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACT GACTGCAGACAAATCGTCCAGCACAGCCTACATGC AGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTC TATTTCTGTGCAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCA AGGGACTCTGGTCACTGTCTCT
4	8E12	Chuỗi nhẹ	7	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTC GGTTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCA AGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAG ACATATTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCA GGCTCCAAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAAAC TGGACCCTGGCATCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGT GGATCAGAAACAGATTTTACACTTAAAATCAGCAG AGTGGAGGCTGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCT TGCAAGGTACATATTATCCGTACACGTTCTGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAG
5	8F1	Chuỗi nặng	9	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGCAGATGTCCTGTAAGG CTTCTGGCTATATTTTACCGGCTACTGGATGTACT GGGTGAAGCAGAGGCCTGGCCAAGGCCTTGAGTG GATTGGAAGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTA ACTACAATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATT GACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGC AACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTC TATTACTGTACCCATGCCCTTGCTTACTGGGGCCA AGGGACTCTGGTCACTGTCTCT
6	8F1	Chuỗi nhẹ	11	GATGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTG ATTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAA GTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAA CCTATTTGAGTTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAG TCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTCAACT GGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTG GATCAGGAACAGATTTTACACTGAAGATCAGCAG AGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTGTATTACTGCG TGCAAGGTACACATTTATTACGTTCTGGCTCGGGG ACAAAGTTGGAAATAAAA

7	1D3	Chuỗi nặng	13	CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGG CTTCTGGCTACACCTTCACAGACTACTATATAAAC TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGT GGATTGGAAAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACT TACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACAC TGA CTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGT CTATTTCTGTGCAAGATGGGATGCTTACTGGGGCC AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
8	1D3	Chuỗi nhẹ	15	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTC GGTTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCA AGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAG ACATATTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCA GGCTCCAAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAAAC TGGACCCTGGCATCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGT GGATCAGAAACAGATTTTACACTTAAAATCAGCAG AGTGGAGGCTGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCT TGCAAGGTACATATTATCCGTACACGTTTCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAA
9	5F9	Chuỗi nặng	17	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGT TGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCT GTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAG CTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAACACCA ACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATA TCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAA GCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTT ATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGT AACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
10	5F9	Chuỗi nhẹ	19	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTC TGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCCTGG TATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT CATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCC CAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA GTTCACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCT GGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAACGTGGA AATCAAA

11	5H3	Chuỗi nặng	21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTGACTGCTACATGAGC TGGATCCGCCAGTCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTTTCATACATTACTACTAGTGGTAATACCATT ACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATC TCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCA AATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGACTGGGGATGGTTCTACGG TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC GTCTCCTCA
12	5H3	Chuỗi nhẹ	23	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTGCC GTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAA GTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATGGAAAGA CCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAG CCTCCACAACCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCG GTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTAGCAGCG GGTCNNGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCG GGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCA TGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACGTTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATCAA
13	6H8	Chuỗi nặng	25	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGG TCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCA CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAA ATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCA TCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTAC TTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGT CTCCTCA
14	6H8	Chuỗi nhẹ	27	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACC TGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCA GGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAAC ACCTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCA GCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACC GCTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCACTGGCAGT GGGGCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCA GGGTGGGAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC ATGCAAGCTACGCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGG GACACGACTGGAGATTAA

15	8C2	Chuỗi nặng	29	caggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggTCCC TGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCA GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGCTATATGGT ATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGCCTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCTGTATTTTACTGTGCGAGAGG GAGGAGCAGCTCGTATTTTGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
16	8C2	Chuỗi nhẹ	31	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACC TGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCA GGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAAC ACCTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCA GCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACC GCTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGT GGGGCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCA GGGTGGGAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC ATGCAAGCTACGCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGG GACACGACTGGAGATTAAA
17	10C10	Chuỗi nặng	33	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGG TCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCA CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG TGGGTGGCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAA ATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCA TCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTAC TTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT CTCCTCA
18	10C10	Chuỗi nhẹ	35	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACC TGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCTTCTCCTGCA GGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAAC ACGTACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCA GCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGATTTCTAACC GGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGT GGGGCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCA GGGTGGAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC ATGCAAGCTACACAATTTCCAACCTTCGGCCAAGG GACACGACTGGAGATTAAA

35	10D3	Chuỗi nặng	286	CAGGTGCA GCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCC TCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTT ACTACTGGAGCTGG ATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGA TTGGGGAAATCAATCA TCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGA GTCGAGTCACCATAT CAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAG CTGAGTTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGA ACGTGGATACACCTA TGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCA
36	10D3	Chuỗi nhẹ	288	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTC TTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTG TTAGCAGCAGGTACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC AGGCTCCTCATCTAT GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCACCCCAGACA GGTTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC TGGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTATTTCTGTGCAGCAGTATGAAAGGTCA TTCACCTTTCGGCCCT GGGACCAAAGTGGAT
19	Abx-012	Chuỗi nặng	238	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGG TGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT GTCTCTGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGC AGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCG TATCTATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGT CGAGTCACCGTGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGT GTATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACT TTGACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

20	Abx-012	Chuỗi nhẹ	240	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTC TTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGC AGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTA TGGTAGCTCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGG TGGAGATCAA AC
21	Abx-020	Chuỗi nặng	37	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGC TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGATTTCATACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATA TACTACTCAGCCTCTGTGAAGGGCCGATTACCAT CTCCAGGGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGC AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT GTATTACTGTGCGAGAGATTTTCAGTGGCTGGTTCG GAGTCCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTCTCCTCG
22	Abx-020	Chuỗi nhẹ	39	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCC GTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAA GTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGAAAGA CCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAG CCTCCACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCG GTTCTCTGGAGTGCCAAATAGGTTTCAGTGGCAGCG GGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCG GGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCA TGCAAAGTATACAACTTACGTGGACGTTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATCAA
23	Abx-106	Chuỗi nặng	242	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGG TGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT GTCTCTGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGC AGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCG TATCTATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGT CGAGTCACCGTGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGT GTATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACT TTGACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC

24	Abx-106	Chuỗi nhẹ	244	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTC TTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGC AGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GGTACATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGACTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTA TGGTAGCTCACCCATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAACG
25	Abx-198	Chuỗi nặng	41	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACT GGGTCTCAGATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTCACCAT CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC AAATGCACAGCCTGAGCGCCGAGGACACGGCCAT ATATTACTGTGCGAAACGGCGGTGGCAGGGGTACT TCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTC TCCTCA
26	Abx-198	Chuỗi nhẹ	43	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTC TTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCA TCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGA AGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTA GCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAA
27	Abx-221	Chuỗi nặng	246	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGG TATTAGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGG CCGTATATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTGG AGTGGTCCATT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACGTCT CCTCAGC

28	Abx-221	Chuỗi nhẹ	248	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTC TGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGTAGAAGCTTAGCCTGGTACCAGCAGA AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGT GCATCCACCA GGGCCACTGGGATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGT GGGTCTGGGACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGTCT GAAGATGTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAA TAACTGGATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGC TGGAGATCAA ACG
29	Abx-229	Chuỗi nặng	45	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTTAGCCGCTATGCCATGAAC GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCAGGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACAT ACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATC TCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTATATCTGCA AATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTA TATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTTGGAGTGG TCCATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CCGTCTCCTCA
30	Abx-229	Chuỗi nhẹ	47	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTC TGTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT CATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCC CAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA ATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTACTGTCACCAGTATAGTAACT GGATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
31	Abx-338	Chuỗi nặng	49	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGG TGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT GTCTCTGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTGGAG CTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAG TGGATTGGACGTATTTATATCAGTGGGAGGACCAC CTTCAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATAT CAGTGGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAG CTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTA TTTCTGTGCGAGAGATAGATATTATGGCTACCTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCC TCA

32	Abx-338	Chuỗi nhẹ	51	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTC TTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACTTAGCC TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATCTATGATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCA TCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGA AGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTA GTTACCCGAGCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTG GAGATTA
33	Abx-393	Chuỗi nặng	53	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGG TGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT GTCTCTGGCGGCTCCATCCGTCATTACTACTGGAG CTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAG TGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAA CTACAACCTCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATAT CAAGAGACACGTCCAAGAATCAGGTCTCCCTG AAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGT GTATTATTGTGCGGCGGGTATGGGCTTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
34	Abx-393	Chuỗi nhẹ	55	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTCCCTGTCT GCATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCG GGCAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTAGGCTGGT ATCAGCTGAAACCGGGGAAAGCCCCTAAGCGCCT GATCTATTCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCC CATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGA ATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGG ATTCTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTT TCCCTCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA ATCAAA

Bảng 5: Trình tự axit amin của các CDR

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
1	3G1	VH CDR1	58	RNAIS
2	3G1	VH CDR2	60	VIWTGGGTNYNSALKS
3	3G1	VH CDR3	62	SGYDGFY
4	3G1	VL CDR1	64	SASSSVNYMH
5	3G1	VL CDR2	66	DTSKLAS

6	3G1	VL CDR3	68	QQWSGNPYT
7	8E12	VH CDR1	70	DYYIN
8	8E12	VH CDR2	72	KIGPRSGNTYYNEKFKG
9	8E12	VH CDR3	74	WDAY
10	8E12	VL CDR1	76	KSSQSLLYSNGKTYLN
11	8E12	VL CDR2	78	QVSKLDP
12	8E12	VL CDR3	80	LQGTYYPYT
13	8F1	VH CDR1	82	GYWMY
14	8F1	VH CDR2	84	RIHPSDSNTNYNQKFKG
15	8F1	VH CDR3	86	ALAY
16	8F1	VL CDR1	88	KSSQSLLYSNGKTYLS
17	8F1	VL CDR2	90	LVSQ LDS
18	8F1	VL CDR3	92	VQGTHLFT
19	1D3	VH CDR1	94	DYYIN
20	1D3	VH CDR2	96	KIGPRSGSTYYNEKFKG
21	1D3	VH CDR3	98	WDAY
22	1D3	VL CDR1	100	KSSQSLLYSNGKTYL
23	1D3	VL CDR2	102	QVSKLDP
24	1D3	VL CDR3	104	LQGTYYPYT
25	5F9	VH CDR1	106	GYYSWS

26	5F9	VH CDR2	108	EINHRGNTNDNPSLKS
27	5F9	VH CDR3	110	ERGYTYGNFDH
28	5F9	VL CDR1	112	RASQSVSRNLA
29	5F9	VL CDR2	114	GASTRAT
30	5F9	VL CDR3	116	QQYKTPRT
31	5H3	VH CDR1	118	DCYMS
32	5H3	VH CDR2	120	YITTSGNTIYYADSVKG
33	5H3	VH CDR3	122	DWGWIFYGMDV
34	5H3	VL CDR1	124	KSSQSLHNDGKTYLY
35	5H3	VL CDR2	126	EVSNRFS
36	5H3	VL CDR3	128	MQSIQLPRT
37	6H8	VH CDR1	130	SYGMH
38	6H8	VH CDR2	132	AIWYDGSNKYYADSVKG
39	6H8	VH CDR3	134	GRSSSYFDY
40	6H8	VL CDR1	136	RSSQSLVHSDGNTYLS
41	6H8	VL CDR2	138	KTSNRFS
42	6H8	VL CDR3	140	MQATQFPT
43	8C2	VH CDR1	142	SYGMH
44	8C2	VH CDR2	144	AIWYDGSNKYYAASVKG
45	8C2	VH CDR3	146	GRSSSYFDY

46	8C2	VL CDR1	148	RSSQSLVHSDGNTYLS
47	8C2	VL CDR2	150	KTSNRFS
48	8C2	VL CDR3	152	MQATQFPT
49	10C1 0	VH CDR1	154	SYGMH
50	10C1 0	VH CDR2	156	AIWYDGSNKYYADSVKG
51	10C1 0	VH CDR3	158	GRSSSYFDY
52	10C1 0	VL CDR1	160	RSSQSLVHSDGNTYLS
53	10C1 0	VL CDR2	162	KISNRFS
54	10C1 0	VL CDR3	164	MQATQFPT
103	10D3	VH CDR1	291	GYYSWS
104	10D3	VH CDR2	293	EINHRGNTNDNPSLKS
105	10D3	VH CDR3	295	ERGYTYGNFDH
106	10D3	VL CDR1	297	RASQSVSSRYLA
107	10D3	VL CDR2	299	GASSRAT
108	10D3	VL CDR3	301	QQYERSFT
55	Abx- 012	VH CDR1	251	HYYWS
56	Abx- 012	VH CDR2	253	RIYISGRTSYNPSLKS
57	Abx- 012	VH CDR3	255	DRLTGYFDY
58	Abx- 012	VL CDR1	257	RASQSVSSSYLA
59	Abx- 012	VL CDR2	259	GASSRAA

60	Abx-012	VL CDR3	261	QQYGSSLT
61	Abx-020	VH CDR1	166	DYYMS
62	Abx-020	VH CDR2	168	YITSSGSTIYYASVKG
63	Abx-020	VH CDR3	170	DFSGWFGVHFDY
64	Abx-020	VL CDR1	172	KSSQSLLHSDGKTYLY
65	Abx-020	VL CDR2	174	EVSNRFS
66	Abx-020	VL CDR3	176	MQSIQLTWT
67	Abx-0106	VH CDR1	263	HYYWS
68	Abx-106	VH CDR2	265	RIYISGRTSYNPSLKS
69	Abx-106	VH CDR3	267	DRLTGYFDY
70	Abx-106	VL CDR1	269	RASQSVSSSYLA
71	Abx-106	VL CDR2	271	GTSSRAT
72	Abx-106	VL CDR3	273	QQYGSSPMCS
73	Abx-198	VH CDR1	178	SYAMS
74	Abx-198	VH CDR2	180	DISGSGGSTYYADSVKG
75	Abx-198	VH CDR3	182	RRWQGYFDL
76	Abx-198	VL CDR1	184	RARQRVDSRYLA
77	Abx-198	VL CDR2	186	GASSRAT
78	Abx-198	VL CDR3	188	QQYGSSPLT
79	Abx-221	VH CDR1	275	RYAMN

80	Abx-221	VH CDR2	277	GISGSGGSTYYADSVKG
81	Abx-221	VH CDR3	279	DRDFWSGPFDY
82	Abx-221	VL CDR1	281	RASQSVSRSLA
83	Abx-221	VL CDR2	283	GASTRAT
84	Abx-221	VL CDR3	285	QQYNNWMCS
85	Abx-229	VH CDR1	190	RYAMN
86	Abx-229	VH CDR2	192	GISGSGGRITYYADSVKG
87	Abx-229	VH CDR3	194	DRDFWSGPFDY
88	Abx-229	VL CDR1	196	RASQSVSRNLA
89	Abx-229	VL CDR2	198	GASTRAT
90	Abx-229	VL CDR3	200	HQYSNWMCS
91	Abx-338	VH CDR1	202	SYYS
92	Abx-338	VH CDR2	204	RIYISGRITTFNPSLKS
93	Abx-338	VH CDR3	206	DRYYGYLDY
94	Abx-338	VL CDR1	208	RASQSVSRSYLA
95	Abx-338	VL CDR2	210	DASSRAT
96	Abx-338	VL CDR3	212	QQYGSSPST
97	Abx-393	VH CDR1	214	HYYWS
98	Abx-393	VH CDR2	216	YIYYSGSTNYNLSLKS
99	Abx-393	VH CDR3	218	GMGFDY

100	Abx-393	VL CDR1	220	RASQAIRNDLG
101	Abx-393	VL CDR2	222	SASSLQS
102	Abx-393	VL CDR3	224	LQHNSFPPT
109	liên ứng	VH CDR1	302	x-x/Y-x/Y-M/W-S/N
110	liên ứng	VH CDR2	303	x-I-x-x-SG-[x hoặc không]-x-T/I-[y/T/S]-x-x-L/V-K-s/G
111	liên ứng	VH CDR3	304	[4-6x]-G-[2-3x]-D-Y
112	liên ứng	VL CDR1	305	R/K-A/S-SQS-V/L-S/L-[5-9x]
113	liên ứng	VL CDR2	306	x-x-S-x-R-x-x
114	liên ứng	VL CDR3	307	Q/H/M-Q-Y/S-[5-7x]

Bảng 6. Trình tự axit nucleic của các CDR

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit nucleic
1	3G1	VH CDR1	57	AGAAATGCTATAAGC
2	3G1	VH CDR2	59	GTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTAT AATTCAGCTCTCAAATCC
3	3G1	VH CDR3	61	AGTGGTTACGACGGGTTTGATTAC
4	3G1	VL CDR1	63	AGTGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGCAC
5	3G1	VL CDR2	65	GACACATCCAACTGGCTTCT
6	3G1	VL CDR3	67	<u>CAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACG</u>
7	8E12	VH CDR1	69	GACTACTATATAAAC
8	8E12	VH CDR2	71	AAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC

9	8E12	VH CDR3	73	TGGGATGCTTAC
10	8E12	VL CDR1	75	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT
11	8E12	VL CDR2	77	CAGGTGTCCAAACTGGACCCT
12	8E12	VL CDR3	79	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
13	8F1	VH CDR1	81	<u>GGCTACTGGATGTAC</u>
14	8F1	VH CDR2	83	<u>AGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAACT</u> <u>ACAATCAAAAGTTCAAGGGC</u>
15	8F1	VH CDR3	85	<u>GCCCTTGCTTAC</u>
16	8F1	VL CDR1	87	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAAACCTATTTGAGT
17	8F1	VL CDR2	89	CTGGTGTCTCAACTGGACTCT
18	8F1	VL CDR3	91	GTGCAAGGTACACATTTATTCACG
19	1D3	VH CDR1	93	GACTACTATATAAAC
20	1D3	VH CDR2	95	AAGATTGGTCCTAGAAAGTGGTAGTACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC
21	1D3	VH CDR3	97	TGGGATGCTTAC
22	1D3	VL CDR1	99	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT
23	1D3	VL CDR2	101	CAGGTGTCCAAACTGGACCCT
24	1D3	VL CDR3	103	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
25	5F9	VH CDR1	105	GGTTACTACTGGAGC
26	5F9	VH CDR2	107	GAAATCAATCATCGTGGAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG
27	5F9	VH CDR3	109	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
28	5F9	VL CDR1	111	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTA GCC

29	5F9	VL CDR2	113	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
30	5F9	VL CDR3	115	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG
31	5H3	VH CDR1	117	GACTGCTACATGAGC
32	5H3	VH CDR2	119	TACATTACTACTAGTGGTAATACCATTACT ACGCAGACTCTGTGAAGGGC
33	5H3	VH CDR3	121	GACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTC
34	5H3	VL CDR1	123	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATG GAAAGACCTATTG
35	5H3	VL CDR2	125	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
36	5H3	VL CDR3	127	ATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACG
37	6H8	VH CDR1	129	AGCTATGGCATGCAC
38	6H8	VH CDR2	131	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC
39	6H8	VH CDR3	133	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
40	6H8	VL CDR1	135	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
41	6H8	VL CDR2	137	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
42	6H8	VL CDR3	139	ATGCAAGCTACGCAATTTCCAACC
43	8C2	VH CDR1	141	AGCTATGGCATGCAC
44	8C2	VH CDR2	143	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGCCTCCGTGAAGGGC
45	8C2	VH CDR3	145	GGGAGGAGCAGCTCGTATTTTGACTAC
46	8C2	VL CDR1	147	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
47	8C2	VL CDR2	149	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
48	8C2	VL CDR3	151	ATGCAAGCTACGCAATTTCCA

49	10C10	VH CDR1	153	AGCTATGGCATGCAC
50	10C10	VH CDR2	155	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC
51	10C10	VH CDR3	157	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
52	10C10	VL CDR1	159	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACGTACTIONTGAOT
53	10C10	VL CDR2	161	AAGATTTCTAACCGGTTCTCT
54	10C10	VL CDR3	163	ATGCAAGCTACACAATTTCCAACC
103	10D3	VH CDR1	290	GGTTACTACTGGAGC
104	10D3	VH CDR2	292	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG
105	10D3	VH CDR3	294	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
106	10D3	VL CDR1	296	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTAC TTAGCCT
107	10D3	VL CDR2	298	GGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
108	10D3	VL CDR3	300	CAGCAGTATGAAAGGTCATTCACTT
55	Abx-012	VH CDR1	250	CATTACTACTGGAGC
56	Abx-012	VH CDR2	252	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT
57	Abx-012	VH CDR3	254	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC
58	Abx-012	VL CDR1	256	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC
59	Abx-012	VL CDR2	258	GGTGCATCCAGCAGGGCCGCT
60	Abx-012	VL CDR3	260	CAGCAGTATGGTAGCTCCCTCACT
61	Abx-020	VH CDR1	165	GACTACTACATGAGC
62	Abx-020	VH CDR2	167	TACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACT ACTCAGCCTCTGTGAAGGGC
63	Abx-020	VH CDR3	169	GATTTCACTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTG ACTAC

64	Abx-020	VL CDR1	171	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATG GAAAGACCTATTTGTAT
65	Abx-020	VL CDR2	173	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
66	Abx-020	VL CDR3	175	ATGCAAAGTATACAACCTTACGTGGACG
67	Abx-106	VH CDR1	262	CATTACTACTGGAGC
68	Abx-106	VH CDR2	264	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT
69	Abx-106	VH CDR3	266	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC
70	Abx-106	VL CDR1	268	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC
71	Abx-106	VL CDR2	270	GGTACATCCAGCAGGGCCACT
72	Abx-106	VL CDR3	272	CAGCAGTATGGTAGCTCACCCATGTGCAGT
73	Abx-198	VH CDR1	177	AGCTATGCCATGAGC
74	Abx-198	VH CDR2	179	GATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC
75	Abx-198	VH CDR3	181	CGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTC
76	Abx-198	VL CDR1	183	AGGGCCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTAC TTAGCC
77	Abx-198	VL CDR2	185	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT
78	Abx-198	VL CDR3	187	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACT
79	Abx-221	VH CDR1	274	CGCTATGCCATGAAC
80	Abx-221	VH CDR2	276	GGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC
81	Abx-221	VH CDR3	278	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT AC
82	Abx-221	VL CDR1	280	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAGCTTA GCC
83	Abx-221	VL CDR2	282	GGTGCATCCACCAGGGCCACT

84	Abx-221	VL CDR3	284	CAGCAGTATAATAACTGGATGTGCAGT
85	Abx-229	VH CDR1	189	CGCTATGCCATGAAC
86	Abx-229	VH CDR2	191	GGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGC
87	Abx-229	VH CDR3	193	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT AC
88	Abx-229	VL CDR1	195	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAACTTA GCC
89	Abx-229	VL CDR2	197	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
90	Abx-229	VL CDR3	199	CACCAGTATAGTAACTGGATGTGCAGT
91	Abx-338	VH CDR1	201	AGTTACTACTGGAGC
92	Abx-338	VH CDR2	203	CGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCA ACCCCTCCCTCAAGAGT
93	Abx-338	VH CDR3	205	GATAGATATTATGGCTACCTTGACTAC
94	Abx-338	VL CDR1	207	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACT TAGCC
95	Abx-338	VL CDR2	209	GATGCATCCAGCAGGGCCACT
96	Abx-338	VL CDR3	211	CAGCAGTATGGTAGTTCACCGAGCACC
97	Abx-393	VH CDR1	213	CATTACTACTGGAGC
98	Abx-393	VH CDR2	215	TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACA ACCTCTCCCTCAAGAGT
99	Abx-393	VH CDR3	217	GGTATGGGCTTTGACTAC
100	Abx-393	VL CDR1	219	CGGGCAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTA GGC
101	Abx-393	VL CDR2	221	TCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
102	Abx-393	VL CDR3	223	CTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGACG

Các vector biểu hiện được tạo thành như được mô tả ở trên chứa trình tự mã hóa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mỗi mAb 5F9 và Abx-229.

Sáng chế được minh họa bởi các ví dụ sau, không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể kháng GCC và xác định đặc điểm

Việc tạo ra protein GCC để gây miễn dịch và sàng lọc được tiến hành như sau. Kháng nguyên GCC được điều chế bằng cách tách dòng phụ một phần của gen GCC mã hoá trình tự bao gồm trình tự GCC sau (trình tự tín hiệu và miền ngoại bào) vào vector biểu hiện.

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDA
VNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVL
IGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLS CDYKETLTRLMS PARKLMYFLVNFWKTN DL PF
KTYSWSTS YVYKNGTETEDCFWYLNAL EASVSYSF SHELGFKVVL RQDKEFQDILMDHNRKS
NVIIMCGGPEFLYKLKG DRAVAEDIV IILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLT LSPGNSLL
NSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHA FRNLTFEGYDGPVTL D
DWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPFTWKN SKL (SEQ ID
NO:229)

Vec tơ biểu hiện (pLKTOK107) cung cấp vùng IgG1Fc tận cùng C để dung hợp với trình tự GCC. Vector này bao gồm exon với bản lề IgG1, miền CH2 và CH3, được đột biến để loại xystein không kết cặp khỏi mảnh CH1 trong exon. Vùng IgG1Fc còn được gây đột biến thêm nữa tại lysin 235 và glyxin 237 thành alanin. Cấu trúc này được biểu hiện tái tổ hợp ở tế bào thận bào thai người (HEK) 293 được chuyển nhiễm bằng gen này đối với kháng nguyên SV40 T ở dạng trình tự GCC được tiết ra (các gốc axit amin 24 đến 430 của SEQ ID NO:228) được dung hợp với IgG1 Fc của người tận cùng C. Protein này, tên là TOK107-hIg (tên khác là hGCC-ECD/hIgG1 Fc, SEQ ID NO:317), được tinh chế bằng sắc ký protein A và sắc ký loại trừ kích thước.

Kháng nguyên GCC cũng được điều chế bằng cách tách dòng phụ protein dung hợp ở trên vào vector biểu hiện như pLKTOK111, điều này cho phép dung hợp vùng xuyên màng IgG2a chuột vào đầu tận cùng C. Khi cấu trúc này được biểu hiện tái tổ hợp trên các tế bào CHO, miền ngoại bào GCC được phát hiện trên bề mặt tế bào. Sự biểu hiện cao trên bề mặt tế bào của protein dung hợp GCC-Ig (SEQ ID NO:318) đạt được khi vector pLKTOK111 được đồng chuyển nhiễm với pLKTOK123, nó chứa CD79a (MB-1) và CD79b (B29) của chuột. Dòng vô tính #27 từ phép chuyển nhiễm

này (CHO-GCC#27) được sử dụng làm yếu tố sinh miễn dịch. Tế bào HT-29-GCC#2 cũng được sử dụng làm yếu tố sinh miễn dịch.

Để sàng lọc phân dịch nổi thể lai và các mAb tinh chế bằng ELISA, axit nucleic mã hoá cấu trúc dung hợp GCC được tách dòng vô tính vào vector biểu hiện pCMV1 (Sigma). Các đuôi tinh chế: đuôi FLAG (trong đầu tận cùng N) và đuôi His (trong đầu tận cùng C) cũng được tách dòng vô tính vào cấu trúc. Cấu trúc protein dung hợp được chuyển nhiễm vào các tế bào 293, biểu hiện, và protein tái tổ hợp được tinh chế trên cột ái lực Anti-FLAG® M2-Agarose (Sigma).

Thuốc thử và dòng tế bào. Tế bào HEK293, CHO, và tế bào ung thư ruột kết người T84 và được thu lấy từ ATCC và duy trì theo quy trình ATCC.

Chuột: Chuột C57BL/6 cái, 4-6 tuần tuổi, được mua từ Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY) để tạo ra thể lai chuột. Chuột lai, được nuôi trong nhà cho đến 4-6 tuần tuổi, sinh ra kháng thể IgG2 của người thu được từ Abgenix, Inc. (Fremont, CA) để sinh ra thể lai của người. Tất cả các con chuột được chọn và duy trì theo hướng dẫn của tổ chức Institutional Animal Care và Use Committee of Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Dòng tế bào: Các dòng tế bào được sử dụng cho các thử nghiệm chức năng là các cặp tế bào của tế bào được chuyển nhiễm GCC và tế bào HT29 hoặc HEK293 làm vector đối chứng. Các tế bào HT29 được chuyển nhiễm với GCC có chiều dài đầy đủ trong điều kiện kiểm soát của trình tự khởi đầu EF-1 α hoặc vector rỗng (pLKTOK4) và được chọn trong G418. GCC trong các tế bào này được khẳng định là có đáp ứng cGMP khi tiếp xúc với peptit ST (1-18 hoặc 5-18). Các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm GCC có chiều dài đầy đủ trong điều kiện kiểm soát của trình tự khởi đầu CMV hoặc vector rỗng (pN8mycSV40) và được chọn trong blasticidin. GCC trong các tế bào này có đuôi myc. Các dòng vô tính được chọn để biểu hiện GCC cao nhất là 293-GCC#2, HT29-GCC#2 và HT29-GCC#5. HT29-GCC#2 cũng được sử dụng làm yếu tố sinh miễn dịch để sinh ra các phân tử kháng thể kháng GCC. Các tế bào biểu hiện GCC khác là tế bào CT26. Để phát triển dòng tế bào CT26 biểu hiện GCC, vector pTOK58D được sử dụng. GCC có chiều dài đầy đủ được tách dòng vô tính vào trong vị trí thường được sử dụng để tách dòng chuỗi nặng và luciferaza được tách dòng vô tính vào trong vị trí thường được sử dụng để tách dòng chuỗi nhẹ. Sau khi chuyển

nhắm vào tế bào CT26, sự biểu hiện độc lập của cả GCC và luciferaza được khẳng định. Sự biểu hiện bề mặt của GCC được khẳng định bằng phép đếm dòng tế bào bằng kháng thể 5F9. Dòng #32 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Dòng tế bào ung thư ruột kết T84 biểu hiện GCC nội sinh. Phân tích Taqman của GCC trong mô hình dòng tế bào rộng bộc lộ rằng T84 là dòng tế bào duy nhất biểu hiện mARN đối với GCC. Việc nhuộm màu GCC với mAb chọn lọc GCC trên các hạt tế bào của tế bào T84 thể hiện sự biểu hiện protein GCC đáng kể.

Định lượng mức thụ thể GCC bằng phối tử đánh dấu phóng xạ (độc tố ST) gợi ý rằng tế bào 293-GCC#2 biểu hiện GCC nhiều hơn tế bào T84 trong khi HT29-GCC#2 hoặc #5 biểu hiện các phân tử GCC thấp nhất trong mỗi tế bào.

Dòng tế bào	Thử nghiệm gắn kết tế bào toàn bộ (thụ thể /tế bào)
HT-29-GCC#2/#5	100.000
GCC nội sinh T84	300.000
293-GCC	600.000

Tạo ra mAb của chuột bằng cách gây miễn dịch protein: miễn ngoại bào GCC của người/protein dung hợp Ig của người (TOK107-hIg, 50 μ g) được tạo huyền phù trong nước muối đệm phosphat Dulbecco (PBS; GIBCO, Grand Island, NY) và nhũ hoá bằng thể tích tương đương của tá dược Freund đầy đủ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Chuột C57BL/6 được gây miễn dịch bằng cách tiêm nhũ tương tại ba vị trí dưới da và một trong màng bụng (i.p.). Hai tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu, chuột được gây miễn dịch tăng cường bằng cách tiêm vào trong màng bụng bằng 25 μ g TOK107-hIg trong tá dược Freund không đầy đủ. Một tuần sau, một lượng nhỏ máu được thu lấy từ tĩnh mạch đuôi và hoạt tính gắn kết trong huyết thanh kháng TOK107-Ig được chuẩn độ bằng ELISA. Chuột được chọn để dung hợp khi chuẩn độ của nó vượt mức 1:24.300 bằng ELISA hoặc 1:500 bằng FACS. Chuột được chọn được tăng cường bằng cách tiêm 25 μ g TOK107-hIg trong PBS. Bốn ngày sau, một con chuột được gây chết và huyền phù tế bào lách được điều chế và rửa bằng PBS để dung hợp với tế bào P3. Một tháng sau, các tế bào lách từ 1 con chuột khác được điều chế để dung hợp dung hợp với tế bào P3. Các tế bào dung hợp được thử nghiệm để sinh ra kháng thể gắn kết đặc hiệu với GCC bằng ELISA về sự gắn kết TOK107-hIg so với kháng nguyên không phải là GCC hoặc với vùng Fc của IgG và bằng FACS về sự gắn

kết với tế bào T84, hoặc tế bào Caco-2 hoặc tế bào dòng vô tính HT-29 #2 so với đối chứng vector và so với tế bào MCF-7 không biểu hiện GCC. Isotyp được xác định bằng kit tạo isotyp kháng thể đơn dòng chuột ISOSTRIP® (Roche Diagnostics Mannheim Germany). Các sơ đồ gây miễn dịch và thể dung hợp lai này tạo ra các phân tử kháng thể kháng GCC của chuột 1D3, 8E12, 3G1 và 10B8.

Tạo ra các mAb của người. Chuột *XENOMOUSE* được tạo ra theo kỹ thuật di truyền (Abgenix, Fremont, CA) (8 đến 10 tuần tuổi) được gây miễn dịch để tạo ra các kháng thể đơn dòng của người. Xem, Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green và Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Các sơ đồ gây miễn dịch khác nhau được sử dụng. Trong một sơ đồ, 100 microgam miễn ngoại bào GC-C của người/protein dung hợp Ig của người (TOK107-hIg) được tạo huyền phù trong nước muối đệm phosphat Dulbecco (PBS; GIBCO, Grand Island, NY) và được nhũ hoá bằng một thể tích tương đương tá dược Freund đầy đủ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). *XENOMOUSE*TM được gây miễn dịch bằng cách tiêm nhũ tương này tại ba vị trí dưới da, gốc đuôi và một vị trí trong màng bụng (i.p.). 14 ngày sau lần gây miễn dịch đầu tiên, chuột được gây miễn dịch tăng cường bằng 50µg TOK107-hIg trong tá dược Freund không đầy đủ. Thử nghiệm huyết thanh chỉ ra rằng độ chuẩn là chưa đủ sau khoảng thời gian nghỉ vài tuần, một lần tăng cường thứ hai 50µg TOK107-hIg của người được thực hiện. Hai tuần sau, một lượng nhỏ máu được lấy từ tĩnh mạch đuôi và hoạt tính huyết thanh kháng TOK107-Ig được chuẩn độ bằng ELISA và kháng tế bào HT29-GCC #2 bằng FACS. Chuột được chọn để dung hợp khi độ chuẩn của chúng vượt mức 1:24.300 theo ELISA hoặc 1:500 theo FACS. Gần 3 tháng sau khi tăng cường, chuột được tăng cường bằng 10^7 tế bào HT-29 #2 và ngày tiếp theo tăng cường bằng 50µg TOK107-hIg, cả hai đều trong tá dược Freund không đầy đủ. Chuột đã được gây miễn dịch với sơ đồ trên sinh ra phân tử kháng thể kháng GCC của người 1D2 và 5F9. Chuột đã được gây miễn dịch với sơ đồ trên sinh ra phân tử kháng thể kháng GCC của người 1D2 và 5F9.

Bốn ngày sau, chuột được gây chết và huyền phù tế bào lách được điều chế và rửa bằng PBS để dung hợp. Các tế bào dung hợp được thử nghiệm để tạo ra các kháng thể gắn kết đặc hiệu với GCC bằng ELISA về sự gắn kết TOK107-hIg so với kháng nguyên không phải là GCC hoặc với vùng Fc của IgG và bằng FACS đối với sự gắn kết với các tế bào T84 hoặc tế bào dòng vô tính HT-29 #2 so với đối chứng vector và so

với tế bào MCF-7 không biểu hiện GCC. Isotyp được xác định bằng ELISA hoặc bằng FACS sử dụng các kháng thể thứ cấp đặc hiệu IgG hoặc IgM. Chuột được gây miễn dịch bằng sơ đồ này sinh ra phân tử kháng thể kháng GCC của người 1D2 và 5F9.

Theo sơ đồ khác, tế bào CHO-GCC#27 (5×10^6) bao gồm vector pkTOK111 và biểu hiện miễn ngoại bào GCC trên bề mặt của chúng được sử dụng làm yếu tố sinh miễn dịch hai lần với hai tuần giữa các lần gây miễn dịch BIP (gốc đuôi + trong màng bụng). Sau khi lấy mẫu máu để xác định tính phản ứng kháng GCC bằng ELISA kháng lại TOK107-hIg, chuột được gây miễn dịch tăng cường bằng các tế bào HT-29 GCC #2 (hoặc 3 tuần hoặc nhiều hơn hai tháng từ lần tăng cường trước đó). Bốn ngày sau lần tăng cường cuối cùng, lách tương ứng được thu hoạch để dung hợp tế bào. Các tế bào dung hợp được thử nghiệm để tạo ra các kháng thể gắn kết đặc hiệu với GCC bởi ELISA về độ gắn kết TOK107-hIg so với kháng nguyên không phải là GCC hoặc với vùng Fc của IgG và bằng FACS về sự gắn kết với các tế bào dòng vô tính HT-29 #2 so với đối chứng vector, tế bào T84 hoặc tế bào MCF-7 không biểu hiện GCC. Isotyp được xác định bằng ELISA. Các sơ đồ gây miễn dịch và thể dung hợp lại tạo ra các phân tử kháng thể kháng GCC của người 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3 và 1C9.

Thể lai sinh ra mAb của người: Các tế bào lách được đếm và phối hợp với tế bào u tủy SP 2/0 (ATCC No. CRL8-006, Rockville, MD) tế bào này không có khả năng tiết ra các chuỗi globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ với tỷ lệ lách:u tủy là 2:1. Các tế bào được dung hợp với polyetylen glycol 1450 (ATCC) trong 12 đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ trong môi trường chọn lọc HAT theo quy trình chuẩn. Từ ngày 10 và ngày 21 sau khi dung hợp, các khuẩn lạc thể lai trở nên hiện rõ và phần nổi trên bề mặt nuôi cấy được thu hoạch, sau đó sàng lọc bằng ELISA và FACS.

Tạo ra kháng thể dựa vào kỹ thuật SLAM: Các kháng thể đơn dòng cũng được phân tách bằng kỹ thuật Abgenix's SLAM (Babcock et al PNAS 93:7843-7848 (1996)). Bước đầu tiên trong phương pháp này là gây miễn dịch cho chuột XENOMOUSE được gây miễn dịch bằng kháng nguyên GCC bằng sơ đồ trong số các sơ đồ mô tả sau đây. Sau đó, bước SLAM (Selected Lymphocyte Antibody Method- phương pháp kháng thể lympho bào chọn lọc) liên quan đến việc xác định đầu tiên trong quần thể lớn các tế bào lympho một lympho bào đơn tạo ra kháng thể với tính đặc hiệu hoặc chức năng mong muốn, và sau đó giải phóng khỏi lympho bào thông tin di truyền mã hóa tính đặc hiệu của kháng thể. Vùng biến đổi của lympho bào như vậy

(đầu tiên tạo ra kháng thể IgG2 hoặc IgG4) được khuếch đại và chuyển vào vector mang Isotyp IgG1.

Sơ đồ gây miễn dịch đối với các kháng thể SLAM (ví dụ, Abx-229, -012, -221, -020, -338, -106, -198 hoặc -393) bao gồm việc sử dụng TOK-hIg hoặc TOK-hIg liên hợp với hemocyanin hà (keyhole limpet hemocyanin). Việc gây miễn dịch được thực hiện hoặc là qua miếng dán ở dưới chân (foot pad) hoặc kết hợp gốc đuôi và trong màng bụng. Lần gây miễn dịch đầu tiên 10 μ g yếu tố sinh miễn dịch bao gồm tá được TITERMAX® vàng hoặc tá được Freund đầy đủ. Sáu đến tám liều tăng cường với 5 μ g yếu tố sinh miễn dịch được thực hiện, sử dụng hoặc phèn, tá được TITERMAX® vàng hoặc tá được Freund không đầy đủ. Nếu TITERMAX vàng là tá được đầu tiên, phèn là tá được tăng cường và các lần tăng cường sau được thực hiện với khoảng cách 3 đến 4 ngày. Nếu lần gây miễn dịch đầu tiên và các lần tăng cường sử dụng tá được Freund đầy đủ, sau đó là tá được Freund không đầy đủ, các khoảng giãn liều giữa các lần gây miễn dịch tăng cường được thực hiện với khoảng cách liều khoảng hai tuần. Các thử nghiệm độ chuẩn huyết thanh tại lần gây miễn dịch tăng cường thứ 4 và thứ 6 được thực hiện sau các lần gây miễn dịch tăng cường bổ sung. Lần gây miễn dịch tăng cường cuối cùng trước khi thu hoạch bốn ngày sau khi sử dụng yếu tố sinh miễn dịch trong PBS.

Phân tích mAb bằng ELISA. Các đĩa EIA 96 lỗ gắn kết protein mật độ cao (Costar/Corning, Inc. Corning, NY) được bao bằng 50 μ l/lỗ chứa dung dịch 2 μ g/ml (0,1 μ g/lỗ) của TOK107-hIg và ủ qua đêm ở 4°C. Dung dịch dư bị hút ra và các đĩa được rửa bằng PBS/Tween-20 0,05% (3 lần), sau đó ức chế bằng 1% albumin huyết thanh bò (BSA, fraction V, Sigma Chemical Co., MO) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng (RT) để ức chế sự gắn kết không đặc hiệu. Dung dịch BSA được loại bỏ và 50 μ l/lỗ phản dịch nổi thể lai từ mỗi lỗ trên đĩa dung hợp được bổ sung vào. Các đĩa sau đó được ủ trong 45 phút ở 37°C và rửa ba lần bằng PBS/Tween-20 0,05%. Peroxidaza cải ngựa (HRP)-liên hợp với IgG F(ab)₂ dê kháng chuột hoặc kháng người (H&L) (Jackson Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) pha loãng 1:4000 trong BSA 1% /PBS được bổ sung vào mỗi lỗ và sau đó các đĩa được ủ trong 45 phút ở 37°C. Sau khi rửa, 50 μ l/lỗ dung dịch ABTS (Zymed, South San Francisco, CA) được bổ sung vào. Mật độ của màu xanh của các lỗ dương tính ở bước sóng 405nm được đánh giá trên máy đọc đĩa vi chuẩn Vmax (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Tất cả

các đĩa chứa thể lai cho đáp ứng dương tính sau đó được nhân rộng thành 24 lỗ, tách dòng phụ bằng cách pha loãng hạn chế và phân tích bằng ELISA và FACS. Ba dòng nhỏ tốt nhất được nhân rộng tiếp.

Phân tích mAb bằng phép đếm dòng tế bào. Sàng lọc bằng phép đếm dòng tế bào (FACS) được thực hiện trên tất cả các phần dịch nổi của đĩa dung hợp song song với sàng lọc ELISA. Các tế bào dòng vô tính HT-29#2 hoặc tế bào HT-29 không được chuyển nhiễm được phát triển trong các bình T225 (Costar/Corning, Inc., Corning, NY) trong DMEM (GIBCO) bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (GIBCO). Các tế bào được tách từ bề mặt bình bằng Versene (GIBCO), được chọn và rửa hai lần bằng DMEM, sau đó một lần bằng dung dịch BSA/PBS 1%. Các tế bào được tái tạo huyền phù trong BSA/PBS 1% và 2×10^6 tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ đáy chữ V (Costar) và ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2500 vòng/phút (rửa). Dung dịch rửa được loại ra và phần dịch nổi 50 μ l/lỗ từ mỗi lỗ của đĩa dung hợp được bổ sung. Đậy đĩa lại (Linbro/MP Biomedicals, LLC, Solon, OH) và các đĩa sau đó được xoay nhẹ để tạo huyền phù lại và trộn các tế bào này với phần dịch nổi bề mặt và ủ ở 4°C (trên đá) trong 30 phút. Sau đó, các đĩa được rửa bằng BSA/PBS 1% lạnh (3 lần) và 50 μ l/lỗ IgG F(Ab)2 khỉ kháng chuột được liên hợp FITC (H&L) hoặc IgG F(Ab)2 dê kháng người được liên hợp FITC (H&L) (Jackson) pha loãng theo tỷ lệ 1:50 được bổ sung vào mỗi lỗ trong 30 phút ở 4°C (trên đá trong bóng tối). Các đĩa được rửa lại 3 lần trong BSA/PBS 1% lạnh và cố định trong paraformaldehyt 1% lạnh (Sigma)/PBS. Các tế bào được chuyển vào trong các ống khuẩn lạc (Costar) và phân tích trên máy đếm dòng tế bào FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Các lỗ chứa thể lai bất kỳ thể hiện sự chuyển dịch dương tính sau đó được nhân rộng đến môi trường nuôi cấy 24 lỗ, tách dòng phụ bằng cách hạn chế pha loãng.

Thử nghiệm nội hóa. Sự nội hóa phân tử kháng thể kháng GCC được thử nghiệm ở cả các tế bào biểu hiện GCC và tế bào vector đối chứng, sử dụng kính hiển vi huỳnh quang miễn dịch. Các tế bào được nuôi trên các phiến kính và đặt trên đá trong 10 phút trước khi ủ với 10 μ g/ml kháng thể trong môi trường nuôi cấy lạnh trong 20 phút trên đá. Để nội hóa, môi trường chứa kháng thể được thay thế bằng môi trường nuôi cấy sạch và các tế bào được chuyển đến 37°C trong 2-3 giờ hoặc giữ trên đá. Sau khi rửa trong PBS và cố định nhanh trong paraformaldehyt 4% ở nhiệt độ phòng, các tế bào được làm tăng tính thấm trong 15 phút trong TRITON X-100 0/5%. Việc định

vị kháng thể thử nghiệm được xác định bằng kháng thể kháng IgG đánh dấu huỳnh quang bằng kính hiển vi quét laze đồng tiêu điểm. Các phân tử kháng thể được xác định vị trí trên bề mặt tế bào của các tế bào biểu hiện GCC khi ở trên đá. Khi ủ ở 37°C, 5F9 thể hiện sự nhuộm màu ngắt quãng trong màng tế bào, chỉ thị cho sự nội hóa. Không phát hiện sự nội hóa với các tế bào vector.

Tóm tắt đặc điểm của phân tử kháng thể kháng GCC. Tất cả các kháng thể sinh ra trong đây được thử nghiệm trong một số các thử nghiệm được mô tả ở trên. Bảng 7 tóm tắt đặc điểm *in vitro* đối với mỗi kháng thể này. (T84=tế bào khối u ruột kết của người, MCF7=tế bào khối u vú của người, WB=thẩm tách protein, IP=kết tủa miễn dịch, IHC=mô hóa học miễn dịch; nội hóa bởi tế bào T84 so với tế bào MCF-7)

Bảng 7. Đặc điểm của các phân tử kháng thể kháng GCC

Ab	ELISA		FACS							
	TOK1 07-hIg	TOK8 2-hIg	HT- 29#2	HT- 29	T84	MCF7	WB	IP	IHC	Đồng hóa
8F1	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+		+	
3G1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10B8	+	-	+	-	+	-	-	+	+	
5H3	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
6H8	+	-	+	-	+	-	-	+		+
8C2	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10C10	-	-	+	-	+	-	-	+		
10D3	+	-	+	-	+	-	+	+		
1D2	+	-	+	-	+	-	-	+		
4A12	+	-	+	-	+	-	-	+		
5F9	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1C9	+	-	+	-	+	-	-	+		
Abx-012	+		+				-	+	+	+
Abx-015	+		-				+	+		
Abx-020	+		+				-	+		+
Abx-106	+		+					+		-
Abx-198	+		+					+		+
Abx-221	+		+					+		+
Abx-229	+		+					+		+
Abx-252	+		+					+		+
Abx-338	+		+					+		+
Abx-393	+		+					-		+

Ngoài ra, một số kháng thể được thử nghiệm về khả năng của chúng ức chế dòng ion canxi do ST peptit ở các tế bào biểu hiện GCC. Thử nghiệm cGMP được tiến hành trong các tế bào HT29-GCC#18 với sự có mặt của ST 50nM với sự có mặt hoặc không có mặt phân tử kháng thể kháng GCC. Có sự ức chế phụ thuộc vào liều của dòng ion canxi bởi 5F9. Các kháng thể khác, 5H3 và Abx-338 cũng ức chế dòng ion canxi gây ra do ST.

Đánh giá ái lực tương đối của phân tử kháng thể kháng GCC. Ái lực tương đối (EC50; nồng độ kháng thể để đạt được sự gắn kết bán tối đa) của một số phân tử kháng thể kháng GCC được đánh giá từ phép đo ELISA kháng lại TOK107-hIg và bằng phép đo với các tế bào biểu hiện GCC. Bảng sau thể hiện một số kết quả.

Bảng 8. Giá trị EC50 của các phân tử kháng thể kháng GCC

Kháng thể	EC50, TOK107-hIg, M	EC50, tế bào, M
5F9	$3,65 \times 10^{-8}$	$1,24 \times 10^{-9}$
5H3	$4,16 \times 10^{-9}$	$4,7 \times 10^{-7}$
Abx-338	$4,9 \times 10^{-12}$	$9,0 \times 10^{-8}$
3G1	$2,28 \times 10^{-8}$	$5,8 \times 10^{-10}$
Abx-229	$2,95 \times 10^{-8}$	
Abx-221	$6,55 \times 10^{-9}$	
Abx-020	$4,58 \times 10^{-9}$	
Abx-012	$5,55 \times 10^{-10}$	
Abx-198	$4,77 \times 10^{-8}$	

Đo ái lực của phân tử kháng thể kháng GCC. Hệ BIACORE™ T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) được sử dụng để đo ái lực của kháng thể 5F9 kháng GCC ở 22°C.

Bước 1: MAb 5F9 (chế phẩm A- Prep A) được pha loãng đến nồng độ 20µg/mL trong natri axetat 10mM, độ pH= 4,0 và MAb 5F9 đối chứng (chế phẩm B- Prep B) được pha loãng đến 10µg/mL trong natri axetat 10mM, độ pH= 4,0. Mỗi mAb được cố định đồng hóa trị vào một số các chip CM4 BIACORE bằng các kết hợp amin chuẩn. Đối với mỗi chip CM4 đã được chuẩn bị, chế phẩm A 5F9 được cố định trên hai tế bào dòng ở khoảng 75-100 RU trong khi chế phẩm B 5F9 được cố định vào một tế bào

dòng ở khoảng 70-80 RU. Tế bào dòng thứ tư còn lại của mỗi chip CM4 được sử dụng để làm tế bào dòng đối chứng.

Bước 2: Nồng độ gốc của GCC-ECD-Fc (TOK107-hIg) được xác định bằng các phương pháp được nêu cụ thể bởi Pace et al. trong *Protein Science*, 4:2411 (1995), và Pace and Grimsley trong *Current Protocols in Protein Science* 3.1.1-3.1.9 (2003).

Bước 3: Đối với mỗi chip CM4 đã được chuẩn bị như được mô tả trong Bước 1, GCC-ECD-Fc được tiêm trong vòng 2 phút ở khoảng nồng độ 202 nM – 1,6nM (pha loãng dần 2x) sau đó cách ra 7 phút. Các mẫu được tiêm ngẫu nhiên 3 lần với nhiều chu kỳ tiêm đệm rải rác để làm đối chứng kép. Để thu được số liệu tốc độ phân huỷ có ý nghĩa hơn, ba lần tiêm bổ sung 101nM GCC- ECD-Fc và ba lần tiêm chất đệm bổ sung được thực hiện bằng cách tiêm 2 phút và khoảng thời gian cách ra là 4 giờ. Tốc độ dòng là 100 μ L/phút được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm và tất cả bề mặt được phục hồi bằng xung 20 giây 10mM Glyxin-HCl (độ pH= 2,0). Tất cả các mẫu được điều chế trong chất đệm chạy là nước muối được đệm Hepes, 0,005% polysorbat 20, độ pH= 7,4 (HBS-P) với BSA được bổ sung 100 μ g/mL.

Bước 4: Tất cả số liệu biểu đồ cảm biến (biểu đồ của cộng hưởng bề mặt plasmon với thời gian) được xử lý bằng phần mềm Scrubber 2.0 (phần mềm BioLogic, Campbell, Australia) và hiệu chỉnh toàn bộ thành mô hình tương tác 1:1 bao gồm một số hạng về hằng số vận chuyển khối lượng k_m bằng phần mềm CLAMP™ (Myszka và Morton *Trends Biochem. Sci.* 23:149-150 (1998)).

Mô hình 1:1 sẽ cho sự khớp rất cao với số liệu miễn là các mức cố định mAb được giữ thấp đủ để R_{max} thu được từ việc phân tích toàn bộ dữ liệu biểu đồ cảm biến ít nhất là dưới 12 RU cho mỗi bề mặt. Trong hầu hết các trường hợp, một trong hai bề mặt chế phẩm A 5F9 có giá trị R_{max} quá thấp (dưới 2 RU) để đo được động học đáng tin cậy. Tuy nhiên, số liệu từ hai tế bào dòng gắn kết GCC-ECD-Fc với chế phẩm A 5F9 từ cùng chip CM4 được hiệu chỉnh đồng thời vào thời điểm bất kỳ có thể. Khi các bề mặt mAb được điều chế gây ra giá trị R_{max} cao hơn(> 12 RU), các biểu đồ cảm biến chỉ ra rõ ràng động học phức tạp và do đó mô hình 1:1 khớp dữ liệu kém. Điều này không ngạc nhiên do thực tế rằng GCC-ECD-Fc là một cấu trúc hoá trị hai và mật độ bề mặt cao hơn của mAb cố định có khả năng nhất làm tăng xác suất GCC-ECD-Fc gắn kết mạnh với bề mặt này. Các bản sao ghi chép cho nghiên cứu này chỉ bao gồm

các số liệu hiệu chỉnh tốt với mô hình tương tác 1:1. Các hằng số K_D và tốc độ thu được của tất cả các bản sao của chế phẩm A 5F9 và chế phẩm B mAb đối chứng được lần lượt nêu trong Bảng 9 và Bảng 10.

Bảng 9: Sự gắn kết GCC-Fc với chế phẩm A mAb 5F9 cố định

Bản lập	$R_{\max}$ (RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
A	11	$1,06 \times 10^5$	$1,19 \times 10^{-5}$	112
B	8	$1,20 \times 10^5$	$1,10 \times 10^{-5}$	91,7
C	5	$1,07 \times 10^5$	$2,15 \times 10^{-5}$	201
D	9	$1,22 \times 10^5$	$1,11 \times 10^{-5}$	91,0
E	6,4	$9,64 \times 10^4$	$1,77 \times 10^{-5}$	184
Trung bình (độ tin cậy 95%)		$1,10 (0,13) \times 10^5$	$1,46 (0,59) \times 10^{-5}$	136 (65)

Bảng 10: Sự gắn kết GCC-Fc với chế phẩm B mAb 5F9 cố định

Bản sao	$R_{\max}$ (RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
F	9	$9,68 \times 10^4$	$7,64 \times 10^{-6}$	78,9
G	8	$1,20 \times 10^5$	$1,24 \times 10^{-5}$	103
H	7	$9,09 \times 10^4$	$9,57 \times 10^{-6}$	105
I	12	$1,21 \times 10^5$	$1,54 \times 10^{-5}$	127
Trung bình, (độ tin cậy 95%)		$1,07 (0,25) \times 10^5$	$1,13 (0,54) \times 10^{-5}$	103 (31)

Sự liên hợp của các độc tố với kháng thể

Maytansin. (MAH)-IgG-DM1 của chuột kháng người, và kháng GCC-DM1 được tạo ra theo quy trình một bước để sản xuất ra thể liên hợp gây độc tế bào chứa các maytansinoit như mô tả trong Patent Mỹ số 6,441,163.

Một cách ngắn gọn, các maytansinoit được liên hợp với các kháng thể bằng các quy trình đã công bố. DM1 được liên hợp với các kháng thể bằng các liên kết chéo có chức năng kép khác loại SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimitometyl)xylohexan-1-carboxylat; Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992). DM4 được liên hợp với các kháng thể bằng liên kết chéo có chức năng kép khác loại SPDB (Widdison et al. *J.*

Med. Chem. 49:4392-4408 (2006)). Kháng thể liên kết chéo được tách từ sản phẩm phụ phản ứng chưa được phản ứng bằng sắc ký lọc gel bằng cột SEPHADEX™ G-25.

Các auristatin. Sự liên hợp bởi các auristatin có thể được tiến hành bởi các quy trình đã công bố (ví dụ, Doronina *et al.*, *Nature Biotech.*, 21: 778-784 (2003)). Nói chung, các auristatin được liên kết với xystein của chuỗi kháng thể. Liên kết với xystein đầu tiên được thực hiện bằng cách khử liên kết disulfua trong phân tử kháng thể. Kiểm soát quy trình khử để hạn chế sự khử đến một số chất, nhưng không cần thiết là tất cả, các liên kết disulfua trong chuỗi. Do đó, các auristatin có thể gắn kết ở xystein tự do. Dừng phản ứng liên hợp sau khi loại các sản phẩm phụ phản ứng và trao đổi đệm cho chế phẩm mong muốn.

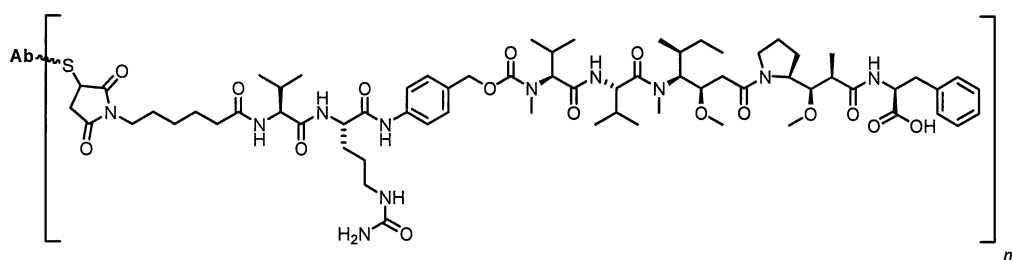
Một cách ngắn gọn, phân tử kháng thể kháng GCC ở nồng độ 7,6mg/mL được cân bằng trước ở 37°C, và sau đó bổ sung một thể tích 15% của natri borat 500mM, độ pH =8,0 để tăng độ pH đến 7,5-8,0. Dung dịch này cũng chứa DTPA 1mM. Kháng thể được khử từng phần bằng cách bổ sung 2,6 đương lượng *tris*(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) cho mỗi mol phân tử kháng thể kháng GCC và khuấy ở 37°C. Sau 28 phút, dung dịch chứa phân tử kháng thể kháng GCC đã khử được đặt lên trên đá, sau đó xử lý ngay lập tức với 4,8-4,9 đương lượng mol (tương ứng với phân tử kháng thể kháng GCC) của đoạn liên kết được chất (ví dụ, mc-vc-MMAF hoặc mc-vc-MMAE hoặc mc-MMAF) là dung dịch 20,5mM trong DMSO. DMSO bổ sung được sử dụng để đưa hỗn hợp đến mức DMSO 10% về thể tích. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trên đá trong ~90 phút trước khi xử lý với lượng mol dư gấp 5 lần của N-acetyl xystein (tương ứng với mc-vc-MMAF). Thể liên hợp được tách bằng cách lọc dòng tiếp tuyến, đầu tiên được cô đặc đến ~10 mg/mL, sau đó siêu lọc với ~10 thể tích siêu lọc của PBS. Thể liên hợp kháng thể được chất thu được có lượng nạp được chất trung bình là khoảng 4 đơn vị được chất- đoạn liên kết cho mỗi kháng thể. Để thuận tiện, trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế và các hình vẽ đính kèm, thể liên hợp miễn dịch auristatin được gọi theo dạng viết tắt như sau, không kể lượng nạp được chất: “Ab-vc-MMAF” để chỉ phân tử kháng thể kháng GCC được liên hợp với mc-vc-MMAF; “Ab-vc-MMAE” để chỉ phân tử kháng thể kháng GCC được liên hợp với mc-vc-MMAE; và “Ab-mc-MMAF” để chỉ phân tử kháng thể kháng GCC được liên hợp với mc-MMAF. Thể liên hợp miễn dịch bao gồm các phân tử kháng thể kháng GCC cụ thể được gọi với cùng một kiểu, ví dụ, 5F9-vc-MMAF, 5F9-vc-MMAE, và 5F9-mc-MMAF.

Để điều chế thể liên hợp kháng thể-dược chất với lượng nạp dược chất trung bình là khoảng hai đơn vị dược chất - đoạn liên kết trong mỗi kháng thể, quy trình (nếu trên) được điều chỉnh bằng cách giảm lượng TCEP là 50%. Lượng của đoạn liên kết dược chất cũng được giảm đi 50%. Thể liên hợp kháng thể-dược chất tương ứng được viết tắt là Ab-vc-MMAF(2).

Điều chế 5F9 vcMMAE

Sử dụng phương pháp tương tự với phương pháp chung nêu trên, mAb 5F9 được liên hợp với dẫn xuất auristatin ký hiệu MMAE (Formula (XIII)) sử dụng đoạn liên kết vc (Val-Cit) được mô tả ở đây để tạo ra thể liên hợp miễn dịch ký hiệu 5F9 vcMMAE. Sự liên hợp của đoạn liên kết vc với MMAE (Seattle Genetics, Inc., Bothell, WA) được hoàn thành như được mô tả ở trên (xem, ví dụ, US 2006/0074008).

Một cách ngắn gọn, dung dịch 17,8mg/mL chứa mAb 5F9 trong axetat 100mM ở độ pH = 5,8 được điều chỉnh đến độ pH = 8 bằng natri phosphat dibazơ 0,3M, tạo ra nồng độ mAb cuối cùng là 11,3mg/ml. Sau đó, DTPA được bổ sung để nồng độ cuối cùng 1mM trong hỗn hợp phản ứng. mAb sau đó được khử từng phần bằng cách bổ sung 2,28 đương lượng mol của TCEP (tương ứng với mol mAb), và sau đó khuấy ở 37°C trong 1,5 giờ. Dung dịch mAb đã khử một phần sau đó được làm lạnh đến 4°C, và 4,4 đương lượng mol vcMMAE (tương ứng với số mol kháng thể) được bổ sung ở dung dịch 20,3mM trong DMSO. Hỗn hợp được khuấy trong 30 phút ở 22°C, sau đó thêm trong 15 phút sau khi bổ sung 5 đương lượng mol N-axetylxystein (tương ứng với số mol vcMMAE). vcMMAE đập tắt dư và các thành phần phản ứng khác được loại bằng cách siêu lọc/lọc thẩm tách thể liên hợp miễn dịch bằng 10 thể tích siêu lọc của PBS, độ pH = 7,4. Thể liên hợp miễn dịch thu được được ký hiệu là 5F9 vcMMAE và có công thức sau:



trong đó Ab là 5F9 mAb, và m là từ 1 đến 8. Lượng dược chất trung bình (m) là khoảng 3,6.

Thử nghiệm gây độc tế bào. Để đo khả năng của mỗi kháng thể gắn kết, nội hoá và diệt các tế bào biểu hiện đích, thử nghiệm gây độc tế bào được thực hiện. Trong thử nghiệm này, các tế bào được ủ với các nồng độ khác nhau của kháng thể kháng GCC sơ cấp không liên hợp và nồng độ không gây độc được cố định của kháng thể thứ cấp kháng Fc của người được liên hợp với DM1 (gây độc tế bào gián tiếp) hoặc với các nồng độ khác nhau của mAb kháng GCC được liên hợp với độc tố (gây độc tế bào trực tiếp). Tỷ lệ sống sót của tế bào được đo bằng thử nghiệm WST sau 4 ngày ủ. Hiệu lực tương đối của kháng thể kháng GCC của người trên các tế bào 293-GCC#2 được trình bày trong Bảng 8 và được xác định bằng mAb của chuột kháng IgG của người được liên hợp với DM1 (MAH-IgG được tinh chế từ dòng vô tính HP607 (CRL1753, ATCC). 5F9 và 229 là dòng mAb có hiệu lực kháng GCC mạnh nhất với giá trị LD50 là 26 và 78pM. Mặc dù không được thể hiện ở đây, sai số thường nằm trong khoảng 20% của các giá trị trung bình, như được đo trong khoảng số lượng bản sao hoặc độ lệch chuẩn > 2 bản sao.

Bảng 11. Kết quả của thử nghiệm gây độc tế bào đối với kháng thể kháng GCC trên tế bào 293-GCC#2

Ab kháng GCC	LD50 (pM)
5F9	26
229	78
106	166
221	207
338	267
12	279
20	569
5H3	722
10D3	1596
8C2	2038
10C10	2443
1D2	>3055
6H8	>4818
393	>5400
198	>5400

Sự gắn kết bề mặt tế bào. Sự gắn kết của 5F9 chưa được liên hợp hoặc 5F9 được liên hợp với các auristatin, được đánh giá bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp bằng phép đếm dòng tế bào. 1×10^6 tế bào/lỗ được phết vào đĩa 96 lỗ đáy chữ V và ủ trên đá trong 1 giờ với các nồng độ pha loãng dần của kháng thể 1-0,001 $\mu\text{g/ml}$. Các tế bào được rửa hai lần bằng FBS 3% trong PBS đá lạnh và ủ với IgG của chuột kháng PE của người (Southern Biotech 2043-09) tỷ lệ 1:200 trong 1 giờ trên đá. Các tế bào được rửa lại và phân tích bằng phép đếm dòng tế bào trên thiết bị đếm dòng tế bào BD FACS Canto II. Số liệu được phân tích bằng phần mềm hệ thống FACS Canto II và mật độ huỳnh quang trung bình được xác định.

Lập bản đồ epitop. Nhiều chiến lược được bắt đầu để xác định epitop.

Dãy peptit. Các peptit 20-me, với đoạn lặp 15 aa được tạo ra, bao phủ lên miền ngoại bào (ECD) vào trong miền xuyên màng GCC (aa 1-440). Các peptit được tổng hợp và sắp xếp thành dãy, cố định trên các phiên thủy tinh. Các dãy này được lai với mỗi trong số các kháng thể kháng GCC để xác định liệu các peptit mạch thẳng là đủ để gắn kết. Abx-198 gắn kết các peptit 55 và 56, trong khi các kháng thể 3G1, 8F1 và 10B8 gắn kết các peptit 55, 56 và 57. Trình tự, ILVDLFNDQYLEDNVTAPDYMKNVLVLTL (SEQ ID NO:225) được kéo dài bởi các peptit này. Vùng lặp giữa các peptit là LEDNVTAPDY (SEQ ID NO:314). Abx-012, Abx-338 và Abx-106 gắn kết peptit 71 và 72. Trình tự, FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID NO:226), và trình tự RNLTFEGYDGPVTL (SEQ ID NO:315) trùng lặp hai peptit.

Sự gắn kết bề mặt tế bào với thể đột biến bị cắt GCC. Các thể đột biến bị cắt của ECD GCC được tạo ra (peptit thành thực FL và 8 đoạn cắt (Δ 1-32, Δ 1-49, Δ 1-94, Δ 1-128, Δ 1-177, Δ 1-226, Δ 1-279, Δ 1-229 và Δ 1-379), là cấu trúc có đuôi FLAG (pFLAG-CMV-3), thể hiện xấp xỉ 50 đoạn bị loại aa. Các cấu trúc được biểu hiện trong 293 tế bào, sau đó bằng cách kết tủa miễn dịch bằng phân tử kháng thể kháng GCC và phép thấm tách Western đối với epitop FLAG trong dịch phân giải của 293 tế bào được chuyển nhiễm bằng các thể đột biến GCC ECD. Kháng thể 5F9 gắn kết tế bào với thể đột biến Δ 1-32, nhưng không phải là tế bào với thể đột biến Δ 1-49. Sự gắn kết của 5F9 với GCC đã mất khi protein này bị cắt đoạn giữa aa 33-50 gợi ý rằng vùng này có liên quan đến sự nhận dạng của 5F9 với epitop gắn kết của nó trên GCC. Tuy

nhien, do các trình tự GCC của chuột cống và chuột nhắt là giống với GCC của người trong vùng này, và 5F9 không gắn kết với GCC của chuột nhắt hoặc chuột cống, kháng thể 5F9 có khả năng gắn kết epitop cấu hình được hình thành do sự có mặt của các axit amin từ 33 đến 50 của GCC người.

Ví dụ 2. Lựa chọn độc tố-đoạn liên kết/ xác định đặc tính ADC

Trong chiến lược thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC-antibody drug conjugate), sự liên hợp của các độc tố có hiệu lực cao với các kháng thể, khả năng gây độc tế bào của độc tố có thể hướng vào các khối u theo cách đặc hiệu đích, phân phối độc tố vào các tế bào khối u biểu hiện kháng nguyên mà không tấn công các tế bào âm tính với kháng nguyên trong các mô bình thường do giảm độc tính toàn thân. Auristatin (đồng đẳng của dolastatin 10) và các độc tố nhóm maytansin được đánh giá là các ADC với mAb kháng GCC. Tất cả các độc tố này đều là chất ức chế sự polyme hóa vi cấu trúc hình ống, hoạt động như các chất ức chế gián phân. Các thử nghiệm trong đó các tế bào được tiếp xúc với các độc tố tự do chỉ ra rằng khả năng gây độc tế bào của các độc tố tự do không khác biệt giữa các tế bào với sự biểu hiện GCC và các tế bào đối chứng không có GCC. Các độc tố tự do là có tiềm năng kháng lại vector 293, các tế bào 293-GCC#2, trong vector HT29 so với tế bào HT29-GCC#5 như được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 12. Khả năng gây độc tế bào của các độc tố tự do

	MMAE		MMAF		DM1		DM4	
Dòng tế bào	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD
293 vector	0,07	6	3,37	2,34	2,83	2,00	0,79	0,79
293 GCC#2	4	3	2,07	1,48	2,96	2,23	0,83	1,03
HT29	4	1	5,21	1,91	2,69	1,09	0,57	0,27
HT29 GCC#5	7	4	7,65	3,32	1,00	0,14	0,40	0,17

Phương pháp hóa học sử dụng để liên hợp các độc tố khác nhau với các kháng thể là khác nhau và ảnh hưởng đến sự ổn định của đoạn liên kết. Sự ổn định của đoạn liên kết ảnh hưởng đến cửa sổ điều trị bằng cách tác động đến sự giải phóng dược chất trong máu hoặc các mô không phải là đích so với dược chất giải phóng ở khối u. Đoạn

liên kết ADC lý tưởng có độ ổn định cao trong máu, nhưng sự giải phóng hiệu quả khi đi vào tế bào qua đích.

Các auristatin

Ba cặp auristatin-đoạn liên kết được đánh giá. Đầu tiên đánh giá các thể liên hợp này *in vitro* và sau đó xác định độc tố-đoạn liên kết với quy mô lớn trong các nghiên cứu *in vivo*, 5F9 được liên hợp với vcMMAE, vcMMAF và mcMMAF (20mg trên mỗi thể liên hợp).

Các auristatin là các độc tố tổng hợp liên quan đến sản phẩm tự nhiên dolastatin 10. MMAE và MMAF hơi khác nhau, với dạng MMAF có nhóm axit carboxylic trong vị trí R2, làm giảm tính thấm tế bào và hiệu lực như độc tố tự do. MMAE là chất nền bơm được chất Pgp, trong khi MMAF thì không.

Các auristatin được liên hợp với xystein ở giữa chuỗi qua quy trình khử kháng thể một phần, phản ứng với dẫn xuất được chất maleimido, đập tắt bằng xystein dư, cô và trao đổi đệm vào trong PBS. Các auristatin có thể được gắn với đoạn liên kết dipeptit nhạy với cathepsin B, là chất được phân cắt khi hấp thu tế bào, hoặc với đoạn liên kết không phân cắt được.

Trong đoạn liên kết vcMonoMetylAuristatin, liên kết dipeptit valin xitrullin được gắn với được chất thông qua nhóm p-amino benzyl carbamat (PAB) và với kháng thể thông qua nhóm liên hợp maleimidido caproyl. Khi nội hóa, đoạn liên kết dipeptit được phân cắt bằng proteaza catepsin B của lysosom, nhóm PAB tự phân hủy, và độc tố tự do được giải phóng. Đoạn liên kết này được thiết kế để duy trì độ ổn định trong huyết thanh trong khi vẫn tối đa hóa sự giải phóng được chất trong tế bào bởi catepsin B.

Các auristatin cũng có thể được liên kết với các kháng thể thông qua các đoạn liên kết không phân cắt được như MMAF được gắn trực tiếp với nhóm liên hợp maleimido, không có liên kết nhạy peptidaza. MC liên hợp với ADC cũng có hiệu quả diệt tế bào qua trung gian đích.

Cơ chế giải phóng được chất của các thể liên hợp auristatin không phân cắt được được cho là thông qua sự phân hủy kháng thể nói chung trong lysosom. Thông

qua các nghiên cứu LC/MS, đã báo cáo rằng các thể liên hợp Ab-mcMMAF giải phóng độc tố ở dạng sản phẩm cộng xystein riêng lẻ.

Sự gắn kết của thể liên hợp kháng thể-dược chất

Tất cả các thể liên hợp kháng thể-dược chất 5F9 được gắn kết với các tế bào 293-GCC#2 như nhau. Bảng 10 thể hiện mật độ huỳnh quang trung bình của các thể liên hợp 5F9 ở các nồng độ tế bào 293-GCC#2 tăng dần. Các nghiên cứu khác xác định rằng thể liên hợp 5F9-SPDB-DM4 gắn kết các tế bào 293-GCC#2 theo cách phụ thuộc nồng độ, trong khi kháng thể 209-SPDB-DM4 lại không gắn kết.

Bảng 13. Biểu đồ các MFI từ thử nghiệm gắn kết của thể liên hợp 5F9 và 5F9 trong các tế bào 293 GCC #2:

	µg/ml của thể liên hợp 5F9 hoặc 5F9					
	0,001	0,004	0,016	0,063	0,25	1
5F9	500	937	2465	6615	7816	8026
vcMMAE	445	696	1787	4854	7296	7416
vcMMAF	440	707	1502	4830	7563	7779
mcMMAF	483	776	2106	5353	7398	7585

Các thể liên hợp 5F9-auristatin độc tố được thử nghiệm trong các thử nghiệm gây độc tế bào trực tiếp của một loạt các tế bào đã được chuyển nhiễm bằng axit nucleic GCC và được chọn để biểu hiện GCC. Một điều tra về mức biểu hiện bề mặt của GCC phát hiện ra rằng các tế bào 293 GCC#2 biểu hiện các lượng cao GCC; Các tế bào HT 29 #2 và CT 26 #2.5 biểu hiện GCC ở mức trung gian đến các mức thấp; các tế bào CT 26 #32 biểu hiện GCC ở mức độ cao; và HT 29 GCC #5 và HT 29 GCC #18 biểu hiện các lượng thấp GCC. Bảng 11 thể hiện sự thu thập của nhiều nghiên cứu cho ra số liệu về khả năng gây độc tế bào đối với ba thể liên hợp auristatin trong các tế bào biểu hiện đích, hoặc trong các tế bào kiểu đại hoặc tế bào vector đối chứng. Sự diệt đích tăng cường được quan sát thấy trong tất cả các trường hợp độc tố được liên hợp 5F9 trên các tế bào 293 GCC #2, với cửa sổ được tăng lên mạnh khi sử dụng MMAF với MMAE. Cả dạng phân cắt được và không phân cắt được của MMAF cũng đều có tiềm năng. Làm đối chứng âm, thể liên hợp kháng thể-dược chất cũng được tạo ra với kháng thể sc209, mà là kháng thể đơn dòng IgG1 của người kháng lại đích không liên quan, và không có tính phản ứng với GCC. Các thử nghiệm gây độc tế bào trực tiếp

với 209 ADC với vcMMAF ADC 5F9 thể hiện rằng khả năng diệt tế bào đích tăng lên trong mô hình tế bào 293 và mô hình tế bào HT29. So sánh hoạt tính độc tố được liên hợp 5F9 trong số các dòng tế bào chỉ ra rằng mức độ gây độc tế bào có một số tương quan với lượng tế bào GCC được biểu hiện bởi các tế bào này. Các số liệu này gợi ý rằng ít nhất một số dòng tế bào biểu hiện GCC nhất nhạy cảm hơn với hoạt tính gây độc tế bào của thể liên hợp là các tế bào biểu hiện các lượng GCC thấp hơn. Xem Ví dụ 1 về số lượng GCC tương ứng trong mỗi tế bào. Yếu tố khác trong sự chênh lệch về mức độ gây độc tế bào có thể là sự khác biệt trong nội hóa hoặc khi xử lý nội bào các thể liên hợp, mà có thể thay đổi trong các dòng tế bào kiểu đại.

Bảng 14. Khả năng gây độc tế bào của các ADC auristatin kháng GCC

	Giá trị LD 50 (nM) của các thể liên hợp 5F9			Giá trị LD50 (nM) của thể liên hợp 209
Dòng tế bào	vcMMAE	vcMMAF	mcMMAF	
Vectơ 293	128	> 10	> 10	
293 GCC # 2	0,37	0,001	0,002	
Vectơ 293	1,8	>10	>10	
293 GCC # 2	0,13	0,005	0,007	
Vectơ 293		>10		>10
293 GCC # 2		0,0004		>10
HT 29 WT	84	> 10	> 10	
HT 29 GCC #2	24,1	0,127	3,1	
CT 26 WT	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #2,5	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #32	267	0,004	0,064	
Vectơ HT 29	520,6	> 10,000	> 10,000	
HT 29 GCC #5	653,5	563,2	> 10,000	
HT 29 GCC #18	554,6	> 10,000	> 10,000	
HT29	0,93	>10	>10	
HT29 GCC#5	0,59	<u>0,32</u>	<u>≥10</u>	
HT29		>10		>10
<u>HT29 GCC#5</u>		<u>0,035</u>		<u>≥10</u>

Nếu các hiệu lực này được sử dụng *in vivo*, với hiệu quả tương đương giữa mc và vcMMAF, MTD được dự đoán cao hơn đối với mcMMAF sẽ gợi ý rằng cửa sổ điều trị cao hơn đối với thể liên hợp này.

Maytansin

Các ADC 5F9-maytansin thể hiện khả năng diệt đích tăng lên ở các tế bào 293-GCC#2 (Bảng 12). Thú vị là, cả hai thể liên hợp 5F9-maytansin thể hiện sự diệt đích tăng lên trong mô hình 293, tuy nhiên không quan sát thấy sự diệt đích tăng lên ở mô hình HT29, làm tăng sự quan tâm về tính ứng dụng của mô hình này để đánh giá *in vivo* các thể liên hợp maytansin. Tiếp nữa, các lý do cho sự khác biệt này là chưa được giải thích rõ, nhưng có thể gán cho các mật độ thụ thể khác nhau và/hoặc sự khác biệt trong nội hóa hoặc xử lý các thể liên hợp trong tế bào. Làm đối chứng âm, thể liên hợp kháng thể-dược chất cũng được tiến hành với kháng thể sc209, là kháng thể đơn dòng IgG1 của người với đích không liên quan, không có tính phản ứng với GCC. Các thử nghiệm gây độc tế bào trực tiếp với các ADC 209 với các ADC 5F9 thể hiện rằng sự diệt tế bào tăng lên theo đích trong mô hình tế bào 293 với tất cả các thể liên hợp 5F9. Trong mô hình tế bào HT29, các thể liên hợp 5F9-DMx và các thể liên hợp 209-DMx diệt như nhau, chỉ ra cơ chế đặc hiệu không theo đích để diệt các tế bào này.

Bảng 15. Khả năng gây độc tế bào của các ADC maytansin kháng GCC

	LD50 (nM)			
Dòng tế bào	5F9-SMCC-DM1	209-SMCC-DM1	5F9-SPDB-DM4	209-SPDB-DM4
Vector 293	25,3		10,4	
293 GCC#2	<0,004		<0,004	
Vector 293	32	11	13	7,4
293 GCC#2	<0,000004	6,7	<0,000004	4,8
HT29	22,4		7,7	
HT29 GCC#5	20,8		9,1	
HT29	22	12	4,8	2,1
HT29 GCC#5	30	22	5,8	4,2

Ví dụ 3: Đánh giá *in vivo*

Mô hình khối u:

Khả năng gây độc tế bào *in vivo* của các ADC 5F9 được đánh giá trong mô hình chuột cấy ghép ngoại lai. Phương pháp *in vivo* đầu tiên được thực hiện với dòng tế bào HT29-GCC#5 và #18. Dòng tế bào 293-GCC#2 cũng được thử nghiệm về sự tăng trưởng *in vivo* và được phát triển làm mô hình chọc ghép từng giai đoạn.

Để xác định câu hỏi liệu mức biểu hiện GCC trong mô hình cấy ghép ngoại lai có liên quan đến mức biểu hiện GCC ở các bệnh nhân mắc ung thư ruột kết di căn hay không, các mức biểu hiện GCC được so sánh bằng phân tích IHC mô cấy ghép ngoại lai, khối u ruột kết sơ cấp của người và di căn. Bảng các dòng tế bào tinh khiết đồng lạnh và các mô được sử dụng để định lượng GCC bằng rIHC với mAb chuột kháng GCC 3G1. Để định tính IHC, việc chấm điểm được thực hiện bằng hệ thống chấm điểm từ 0-3 bán định tính. Nếu các mức GCC của mô hình khối u $\leq$ các mức GCC lâm sàng, việc lấy mẫu sẽ có khả năng là chính xác hoặc đánh giá quá cao sự phơi nhiễm cần thiết trong lâm sàng. Nếu các mức GCC của mô hình khối u $>$ các mức GCC, việc lấy mẫu có thể là đánh giá không đúng mức sự phơi nhiễm cần thiết trong lâm sàng.

Trong khi có một số biến đổi trong việc biểu hiện GCC trong các mẫu di căn, sự biểu hiện bởi các tế bào HT29-GCC#5 và #18 là nằm trong khoảng của nhiều mẫu di căn. Với IHC, việc nhuộm màu của GCC trên các tế bào HT29-GCC#5 và #18 là tương đương hoặc thấp hơn trên các tế bào di căn. Số liệu này gợi ý rằng mô hình khối u của tác giả biểu hiện GCC ở các mức độ so sánh được với các mức được phát hiện trong các mẫu lâm sàng của metCRC.

Bảng 16 thể hiện số đếm nhấp nháy của nhiều mô khác nhau thu hoạch được ở thời điểm 192 giờ với số thể hiện là giá trị trung bình của 3 con chuột. 5F9 được tích lũy ưu tiên trong các khối u HT29-GCC#5 so với khối u HT29-vector, trong khi 209 không thể hiện sự tích lũy khác biệt nhiều. Kết quả này ủng hộ rằng thể liên hợp kháng thể-được chất 5F9 được mong đợi là có thể tích lũy trong các khối u biểu hiện GCC. Trong tất cả các mô được đánh giá khác, có sự chênh lệch nhỏ ở các mức tích lũy kháng thể 5F9 so với mAb 209.

Sự phân bố in vivo của 5F9 đánh dấu phóng xạ ở chuột mang khối u HT29-GCC#5 & vector HT29

Nghiên cứu chụp ảnh phóng xạ ở chuột mang khối u được thực hiện để đánh giá các khối u chọn đích và sự phân bố sinh học *in vivo* của kháng thể kháng GCC 5F9 và kháng thể sc209 đối chứng âm (kháng thể đơn dòng IgG1 người chọn đích là đích bề mặt tế bào không liên quan). Các kháng thể được đánh dấu phóng xạ bằng ^{111}In bằng DTPA là chất tạo chelat hai chức. Cách phản ứng *in vivo*, bao gồm chọn đích khối u và phân bố hoá học trong các mô bình thường theo thời gian, được nghiên cứu với mô hình khối u song song ở chuột với cả khối u GCC(-) và GCC(+). Các ảnh *in vivo* (SPECT/CT) đạt được, và việc đếm hoạt tính phóng xạ mô được sử dụng để hỗ trợ cho độ phân giải không gian.

Các khối u dưới da được phát triển ở chuột trụi lông, với các khối u HT29-vector ở bên trái và khối u HT29-GCC#5 ở bên phải. Các kháng thể được dùng với liều $0,3\text{mCi} = 15\mu\text{g}$ cho mỗi con. Có 3 con trong mỗi nhóm, và các nhóm được thu hoạch tại thời điểm 1 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 120 giờ và 192 giờ.

Một điều tra về các mô từ các động vật trong nhóm 192 giờ chỉ ra rằng cả 5F9 và 209 tích lũy đến mức độ tương tự trong tất cả các mô bình thường (ví dụ, máu, tim, dạ dày, ruột non, ruột già, cơ và da) và trong khối u đối chứng HT29-vector. Ab 209 tích lũy đến các mức độ hơi cao hơn 5F9 trong gan và 5F9 tích lũy đến các mức độ hơi cao hơn so với 209 trong phổi, lách và thận. Trong các khối u HT29-GCC#5, 5F9 ưu tiên được tích lũy ở các mức cao hơn hai lần so với các mức 209. Kết quả này hỗ trợ quan điểm rằng thể liên hợp kháng thể-dược chất 5F9 có thể được mong đợi là tích lũy trong khối u biểu hiện GCC.

Để hiểu rõ động học của sự tích lũy kháng thể trong các khối u, số liệu khối u đối với mỗi kháng thể được thu lấy tại tất cả các thời điểm trong suốt nghiên cứu. Chỉ mô thể hiện sự tích lũy là kháng thể 5F9 trong khối u biểu hiện GCC. Mức hoạt tính phóng xạ trong tất cả các mô khác giữ ở mức độ tương đối thấp, với sự chênh lệch nhỏ giữa các mức 5F9 và mức 209. 5F9 tích lũy hơn trong các khối u HT29-GCC#5, trong khi 209 không biểu hiện sự tích lũy bất kỳ. Kết quả này hỗ trợ quan điểm rằng thể liên hợp kháng thể-dược chất 5F9 có thể hy vọng là tích lũy trong khối u biểu hiện GCC.

Bảng 16. Sự tích lũy mAb đặc hiệu GCC được đánh dấu ^{111}In mà không phải mAb đối chứng đối với khối u biểu hiện GCC.

	% ID 5F9 trung bình	% ID IgG đối chứng trung bình
1giờ	2,816+/-0,133	2,494+/-0,167
24giờ	3,057+/-0,107	3,010+/-0,630
72giờ	4,485+/-1,029	3,564+/-0,152
120giờ	5,162+/-1,012	3,412+/-0,048
192giờ	6,550+/-1,015	2,782+/-0,085

Sự tích lũy của 5F9 được đánh dấu phóng xạ trong các khối u biểu hiện GCC trong 7 ngày được hỗ trợ bằng phác đồ dùng thuốc một tuần một lần.

Nghiên cứu hiệu quả thử nghiệm (pilot) trong các khối u dưới da HT29-GCC#5

Các nghiên cứu được thực hiện để xác định các thể liên hợp hiệu quả và chế độ dùng thuốc ở chuột mang các khối u HT29-GCC#5. Chuột được dùng thuốc với các liều đơn hoặc nhiều liều. Các nghiên cứu được xác định là có độc tính khi dùng thuốc quá thường xuyên ở các mức độ cao thể liên hợp độc tố (ví dụ, 150 $\mu\text{g/kg}$ 5F9vcMMAF với phác đồ dùng thuốc 3 ngày một lần (q3d) x 5). Nghiên cứu khác xác định rằng phác đồ dùng thuốc 14 ngày một lần (q14d) x 5 là quá thừa trong mô hình này để khiến cho một số thể liên hợp độc tố thể hiện hiệu quả có ý nghĩa so với đối chứng. Ngoài ra, nghiên cứu PD với các thể liên hợp maytansinoid-kháng thể trong mô hình này đã chứng tỏ sự tích lũy phosphohiston phụ thuộc vào liều chỉ với độc tố DM4, không phải với độc tố DM1. Nghiên cứu khác trong mô hình này thể hiện một số sự ức chế tăng trưởng khối u bởi thể liên hợp 209 –độc tố không đặc hiệu. Các kết quả gợi ý rằng các mô hình in vivo khác cần được đánh giá.

Nghiên cứu PK/PD với các ADC 5F9 ở chuột mang các khối u 293-GCC#2.

Một mô hình khối u khác sử dụng tế bào 293-GCC#2. Nghiên cứu PD đối với các ADC 5F9 trong chuột mang khối u 293-GCC#2 được thực hiện. Chuột được dùng thuốc với các liều đơn 5F9vcMMAF ở nồng độ 75 $\mu\text{g/kg}$ hoặc 150 $\mu\text{g/kg}$ và huyết thanh được lấy ở thời điểm từ 1 giờ đến 4 ngày để phân tích PD phosphohiston H3 để kiểm tra hiệu quả chống gián phân của độc tố trên các tế bào khối u. Phospho-histon H3

được phát hiện bằng cách nhuộm màu kháng thể (Upstate Biotechnology, hiện này là Millipore, Billerica, MA) các tiêu bản nhúng parafin của khối u. Số liệu trong Bảng 17 thể hiện rằng mỗi ADC gây ra sự tăng đáng kể trong nhóm tế bào dương tính với pH3 trong các khối u chỉ ra rằng mỗi đương lượng liều độc tố ở cả nồng độ 75 và 150 μ g/kg là có thể chạm đến khối u và có hiệu quả ức chế gián phân mong muốn trên các tế bào khối u.

Bảng 17. Đáp ứng PD như được đánh giá bằng cách bắt giữ các tế bào trong gián phân (% tế bào khối u dương tính với pH3) sau một liều ADC 5F9 đơn trong tĩnh mạch (iv.).

	% tế bào khối u dương tính với pH3 trung bình	SD
Tá được đối chứng	2,556801	2,37707
5F9-vcMMAE 75 μ g/kg 1 giờ	4,525187	0,178882
4 giờ	2,551616	1,688255
8 giờ	4,243988	0,352938
24 giờ	9,8199	4,82057
48 giờ	8,692061	4,756786
96 giờ	8,628345	1,065456
5F9-vcMMAE 150 μ g/kg 1 giờ	3,334943	1,351667
4 giờ	2,78543	1,690216
8 giờ	4,575611	1,130484
24 giờ	13,78776	3,343155
48 giờ	14,26067	5,448921
96 giờ	14,67942	1,827724
5F9-vcMMAF 75 μ g/kg 1 giờ	4,235245	0,617585
4 giờ	4,18364	0,846752
8 giờ	4,930098	0,54746
24 giờ	20,22484	2,453935
48 giờ	9,920771	3,788795
96 giờ	10,38187	1,896461
5F9-vcMMAF 150 μ g/kg 1	3,465674	1,341187

giờ		
4 giờ	4,416646	0,807636
8 giờ	8,594385	4,005021
24 giờ	21,53718	7,25212
48 giờ	15,15814	4,28407
96 giờ	11,12288	2,150476
5F9-mcMMAF 75µg/kg 1 giờ	5,365582	1,14198
4 giờ	4,044478	0,992449
8 giờ	8,228597	3,098222
24 giờ	14,10734	1,611093
48 giờ	19,37223	8,146504
96 giờ	7,749388	1,180759
5F9-mcMMAF 150µg/kg 1 giờ	3,212482	0,509604
4 giờ	4,722554	1,577531
8 giờ	9,105349	5,963128
24 giờ	27,51416	10,96057
48 giờ	13,34043	3,414961
96 giờ	15,60917	3,386154

Các nghiên cứu tương tự đo mức phosphohiston ở chuột mang khối u 293-GCC#2 điều trị bằng 5F9vcMMAF, 5F9-SPDB-DM4 và 5F9-SMCC-DM1. Chuột được dùng thuốc với các liều đơn ở nồng độ 150µg/kg và huyết thanh được lấy ở các thời điểm từ 1 giờ đến 21 ngày để phân tích PK cả toàn bộ kháng thể và kháng thể liên hợp với độc tố. Phần trăm tế bào dương tính với phosphohiston H3 trong các khối u 293-GCC#2 tăng lên đáp ứng với tất cả ba ADC: 5F9vcMMAF, 5F9-SMCC-DM1 và 5F9-SPDB-DM4. Mức phosphohiston H3 tối đa được tăng từ 3 đến 5 lần so với mức cơ bản, với các đỉnh ở thời điểm 24 giờ sau khi tiêm.

Nghiên cứu hiệu quả với 5F9vcMMAF và 5F9-DMx trong các khối u 293-GCC#2 dưới da

5F9-SPDB-DM4, 5F9-SMCC-DM1 và 5F9vcMMAF được kiểm tra về hiệu quả trong mô hình khối u 293-GCC#2 ở hai liều (75µg/kg và 150µg/kg độc tố), với phác đồ dùng thuốc q14d x 5. Cụ thể, nghiên cứu này bao gồm đối chứng được điều trị bằng

chất dẫn, Sc209-DM1 (150µg/kg DM1 đương lượng), Sc209-DM4 (150µg/kg DM4 đương lượng), Sc209-vcMMAF (150µg/kg MMAF đương lượng), 5F9-DM1 (150µg/kg DM1 đương lượng), 5F9-DM1 (75µg/kg DM1 đương lượng), 5F9-DM4 (150µg/kg DM4 đương lượng), 5F9-DM4 (75µg/kg DM4 đương lượng), 5F9-vcMMAF (150µg/kg MMAF đương lượng), và 5F9-vcMMAF (75µg/kg MMAF đương lượng). Chuột cái Taconic mang các tế bào 293-GCC#2 (10 con chuột trong mỗi nhóm) được sử dụng.

Fig. 1 minh họa sự phát triển khối u trong chuột SCID mang 293-GCC#2 được điều trị bằng 5F9vc-MMAF, -DM1, và -DM4 với phác đồ dùng thuốc là q14d. Quan sát thấy hiệu quả phụ thuộc liều với 5F9-SPDB-DM4 trong mô hình 293-GCC#2, trong khi đối chứng 209-SPDB-DM4 không có hiệu quả. 5F9-SMCC-DM1 cũng có hiệu quả, tuy nhiên kém hơn 5F9-SPDB-DM4 ở nồng độ 150ug/kg. 5F9vcMMAF (75ug/kg và 150ug/kg) là có hiệu quả nhất, tuy nhiên 209vcMMAF cũng có một số hoạt tính. Do đó ở các liều và phác đồ dùng thuốc này, 5F9-SPDB-DM4 có sự khác biệt về hiệu quả nhất so với thể liên hợp đối chứng của nó.

Nghiên cứu hiệu quả với 5F9vcMMAF và 5F9-DMx trong các khối u dưới da 293-GCC#2

5F9-SPDB-DM4 và 5F9-SMCC-DM1 được kiểm tra về hiệu quả trong mô hình khối u 293-GCC#2 ở hai liều (75ug/kg và 150ug/kg độc tố) với phác đồ dùng thuốc q7d x 5. Cụ thể, nghiên cứu này bao gồm đối chứng được điều trị bằng chất dẫn, một mình 5F9 (15mg/kg), DM1 (300µg/kg), DM4 (300µg/kg), Sc209-DM1 (150µg/kg DM1 đương lượng), Sc209-DM4 (150 µg/kg DM4 đương lượng), Sc209-vcMMAF (150 µg/kg MMAF đương lượng), 5F9-DM1 (150 µg/kg DM1 đương lượng), 5F9-DM1 (75 µg/kg DM1 đương lượng), 5F9-DM4 (150 µg/kg DM4 đương lượng), và 5F9-DM4 (75 µg/kg DM4 đương lượng). Chuột cái Taconic mang các tế bào 293-GCC#2 (10 con chuột trong mỗi nhóm) được sử dụng.

Nghiên cứu hiệu quả với các thể liên hợp auristatin trong khối u 293 GCC#2

Chuột SCID mang khối u 293 GCC#2 được điều trị bằng các thể liên hợp 5F9 với vc MMAE, vcMMAF hoặc mcMMAF ở 3 mức liều so với các thể liên hợp 209 chứa độc tố với các độc tố tự do hoặc đối chứng bằng chất dẫn. Các liều được sử dụng trong tĩnh mạch trong phác đồ dùng thuốc q7d x 4. Các khối u được thu vào ngày 3, 7,

10, 13 và 17. Các khối u ở chuột được điều trị với thuốc thử đối chứng chứng tỏ rằng có sự tăng liên tục về thể tích. Các khối u được điều trị bằng các thể liên hợp auristatin 5F9 thể hiện sự ức chế phụ thuộc vào liều và thời gian đối với sự phát triển khối u này. Bảng 18 tổng kết các kết quả (TGI=sự ức chế phát triển khối u, T/C=điều trị/đối chứng, TGD=làm chậm phát triển khối u, CR/PR=đáp ứng hoàn toàn/đáp ứng một phần; giá trị p = đo để đánh giá ý nghĩa thống kê, NS=không ý nghĩa).

Bảng 18. Phân tích các ADC Auristatin ở chuột mang khối u 293 GCC#2.

Các nhóm	TGI	T/C	TGD	CR/PR	Giá trị P
209-vcMMAE 300µg/kg	24,5	0,76	0,9	0	0,38>0,05 NS
209-vcMMAF 150µg/kg	29,4	0,71	1,4	0	0,27>0,05 NS
209-mcMMAE 150µg/kg	36,5	0,63	1,4	0	0,15>0,05 NS
Free MMAE 300µg/kg	35,6	0,64	2	0	0,18>0,05 NS
Free mcMMAF 150µg/kg	-3,4	1,03	-1,3	0	0,73>0,05 NS
5F9-vcMMAE 300µg/kg	96,9	0,03		9/10 PR	<0,001
5F9-vcMMAE 150µg/kg	83,5	0,17		2/10 PR	<0,01
5F9-vcMMAF 150µg/kg	97	0,03		9/10 PR	<0,001
5F9-mcMMAF 150µg/kg	97	0,03		9/10 PR	<0,001
5F9-vcMMAE 75µg/kg	54,5	0,45	4,4		0,01<p<0,05
5F9-vcMMAF 75µg/kg	88,5	0,12		6/10 PR	<0,001
5F9-mcMMAF 75µg/kg	87,5	0,13		7/10 PR	=0,001
5F9-vcMMAF 37,5µg/kg	65,2	0,35	7,1		=0,01
5F9-mcMMAF 37,5 µg/kg	63,6	0,36	5,8		=0,01

Tất cả ba trong số các ADC là có hiệu quả trong mô hình 293 GCC#2 trong phác đồ dùng thuốc q7d. 5F9-vcMMAF và 5F9-mcMMAF có tiềm lực hơn 5F9-vcMMAE, tương ứng với số liệu PD *in vivo* (pHisH3) và khả năng gây độc tế bào *in vitro*.

Nghiên cứu hiệu quả với 5F9vcMMAF và 5F9-DMx ở các khối u T84 dưới da

5F9-SPDB-DM4 và 5F9-SMCC-DM1 được kiểm tra về hiệu quả trong mô hình khối u T84 với hai mức liều (75ug/kg và 150ug/kg độc tố) trong phác đồ dùng thuốc q7d x 5. Cụ thể, nghiên cứu này bao gồm đối chứng được điều trị bằng chất dẫn, một mình 5F9 (15mg/kg), DM1 (300µg/kg), DM4 (300µg/kg), Sc209-DM1 (150µg/kg DM1 đương lượng), Sc209-DM4 (150µg/kg DM4 đương lượng), Sc209-vcMMAF (150µg/kg MMAF đương lượng), 5F9-DM1 (150µg/kg DM1 đương lượng), 5F9-DM1 (75µg/kg DM1 đương lượng), 5F9-DM4 (150µg/kg DM4 đương lượng), và 5F9-DM4 (75µg/kg DM4 đương lượng). Chuột cái Taconic mang các tế bào T84 (10 con chuột trong mỗi nhóm) được sử dụng.

Mô hóa học miễn dịch

Phát hiện và định lượng các lượng tương đối của GCC trong các mô như sinh thiết và cấy ghép ngoại lai có thể được thực hiện bằng mô hóa học miễn dịch. Các tiêu bản mô đông lạnh được cố định trong dung dịch axeton và metanol theo tỷ lệ 1:1 trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các lát mô này được rửa trong 1 x PBS trong 5 phút. Các lát được xử lý bằng thiết bị nhuộm tự động, như máy nhuộm màu tự động Ventana Discovery XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) bằng đệm phản ứng theo đề xuất của nhà sản xuất. Kháng thể kháng GCC được pha loãng đến 5µg/ml trong 5% huyết thanh dê. Đối với kháng thể kháng GCC của người, ví dụ, 5F9, việc phát hiện kháng thể thứ cấp là dung dịch theo tỷ lệ 1:500 chứa kháng thể của dê kháng kháng thể của người được biotinyl hóa trong khối Dako Protein (Dako, Carpinteria, CA). Sau quy trình tự nhuộm màu, phản ứng kháng thể này, các lát mô được lấy ra khỏi máy tự nhuộm màu, rửa trong đệm phản ứng, khử nước qua các bước chuẩn cho đến khi xylen và phiến kính thu được với môi trường cố định dựa trên xylen.

Nghiên cứu hiệu quả của các ADC trong mô hình khối u sơ cấp

Các mô hình caxinom ruột kết trực tràng sơ cấp và ung thư dạ dày được phát triển dưới dạng các khối u dưới da ở chuột. Các ADC 5F9-vcMMAE và 5F9-mcMMAF được kiểm tra ở chuột mang khối u sơ cấp PHTX-11c. Các liều được sử dụng trong tĩnh mạch trong phác đồ dùng thuốc q7d x 4. Các thể liên hợp của độc tố với 209 được sử dụng cho chuột đối chứng.

Hoạt tính chống khối u của các ADC trong mô hình khối u sơ cấp

Hai nghiên cứu tương tự được thực hiện để xác định hoạt tính chống khối u *in vivo* của 5F9-vcMMAE và để so sánh hoạt tính chống khối u của 5F9-vcMMAE với độc tố tự do MMAE và với thể liên hợp độc tố - kháng thể vcMMAE không miễn dịch (209-vcMMAE) ở chuột cấy ghép ngoại lai khối u trực tràng sơ cấp của người PHTX-9c ở các mức liều khác nhau và phác đồ dùng thuốc và để xác định động học sự phát triển lại khối u sau khi điều trị. Chuột CB-17 SCID cái (tám tuần tuổi) được gây miễn dịch dưới da (SC) vào bên hông với các mảnh khối u PHTX-9c (2mm x 2mm). Sự phát triển khối u được giám sát hai lần mỗi tuần bằng thước cặp cơ và thể tích trung bình của khối u được tính bằng công thức ($0,5 \times [\text{chiều dài} \times \text{chiều rộng}^2]$). Khi thể tích khối u trung bình đạt đến xấp xỉ 150mm³ (Nghiên cứu A) hoặc 160mm³ (Nghiên cứu B), chuột được phân ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị (n = 10/nhóm đối với Nghiên cứu A và n = 9/nhóm đối với Nghiên cứu B).

Chuột được điều trị (Nghiên cứu A) trong phác đồ dùng thuốc tuần một lần (QW) (3 liều) với 5F9-vcMMAE trong tĩnh mạch (IV) hàm lượng 0,938, 1,875, 3,75, hoặc 7,5mg/kg trong 20 ngày hoặc đối chứng, bao gồm chất dẫn (0,9% nước muối), 0,075 hoặc 0,15mg/kg MMAE IV trong phác đồ dùng thuốc QW, hoặc 1,875 hoặc 3,75mg/kg 209-vcMMAE IV trong phác đồ dùng thuốc QW trong 20 ngày. Trong nghiên cứu thứ hai (Nghiên cứu B), chuột được điều trị bằng 5F9-vcMMAE IV hàm lượng 0,938, 1,875, 3,75, 7,5, hoặc 10,0mg/kg trong phác đồ dùng thuốc QW (3 liều) hoặc 3,75mg/kg IV trong phác đồ dùng thuốc hai lần/tuần (BIW) (6 liều), hoặc đối chứng bao gồm chất dẫn, 209-vcMMAE hàm lượng 75 hoặc 10mg/kg, hoặc 0,135 hoặc 0,18mg/kg MMAE sử dụng IV trong phác đồ dùng thuốc QW trong 20 ngày. Các liều được sử dụng vào ngày 1, 8, và 15 trong phác đồ dùng thuốc QW và ngày 1, 4, 8, 11, 15, và 18 trong phác đồ dùng thuốc BIW. Liều của MMAE tự do được tính toán để khớp với lượng MMAE trong các liều của thể liên hợp miễn dịch theo cách hợp lý: Liều đương lượng của MMAE là 1,8% của liều MLN0264. Liều đương lượng của đoạn liên kết + MMAE là 4% của liều 5F9-vcMMAE. Các kết quả tính toán là dựa trên 3,9 phân tử MMAE trung bình/kháng thể và trọng lượng phân tử kháng thể tự do là 150kD. Trọng lượng phân tử kháng thể thực tế sẽ thay đổi nhẹ do mức độ glycosyl hóa.

Thể tích khối u và trọng lượng cơ thể được đo hai lần mỗi tuần và được tiếp tục trong giai đoạn điều trị để đo được động học sự phát triển lại khối u, như được chứng tỏ bằng độ trễ phát triển khối u (TGD). Việc đo thể tích khối u được tiếp tục cho đến khi thể tích khối u đạt 10% trọng lượng cơ thể ở mỗi con chuột trong nhóm điều trị, tại thời điểm đó nhóm được kết thúc. Phần trăm ức chế sự phát triển khối u (TGI) ($[\text{thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng} - \text{thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị}] / \text{thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng}$; tỷ lệ T/C) được xác định vào ngày 20. Các tỷ lệ T/C trong nhóm điều trị được so sánh với tỷ lệ T/C của nhóm đối chứng bằng cách sử dụng thử nghiệm T Welch 2 nhánh (two-tailed Welch's t-test). Do toàn bộ nhóm được kết thúc nếu một khối u đạt giới hạn kích thước (khoảng 1000mm³), TGD có thể không được tính đối với các nhóm trong đó sự phát triển lại khối u trung bình là chậm.

Sự khác biệt của sự phát triển khối u theo thời gian giữa các cặp nhóm điều trị được đánh giá bằng mô hình hồi quy hiệu quả phối hợp tuyến tính. Các mô hình này giải thích cho thực tế là mỗi động vật được đo ở nhiều thời điểm khác nhau. Một mô hình riêng biệt được hiệu chỉnh cho mỗi lần so sánh, và các diện tích dưới đường cong (AUC) của mỗi nhóm điều trị được tính toán bằng các giá trị dự đoán từ mô hình này. Phần trăm giảm AUC (dAUC) tương ứng với nhóm đối chứng sau đó được tính toán. Giá trị *P* có ý nghĩa thống kê (< 0.05) gợi ý rằng xu hướng theo thời gian đối với hai nhóm điều trị là khác nhau. Các kết quả được tổng hợp trong Bảng 19 và 20 sau đây.

Hoạt tính chống khối u được quan sát thấy ở tất cả các nhóm được điều trị bằng 5F9-vcMMAE ở cả hai nghiên cứu và hiệu quả này được thể hiện là phụ thuộc vào liều. Các kết quả của hai nghiên cứu này là có thể so sánh. Ở chuột được điều trị bằng 5F9-vcMMAE với hàm lượng 0,938mg/kg, IV trong phác đồ dùng thuốc QW, giá trị TGI là 20,7-21,4%, giá trị *p* là $< 0,05$ so với nhóm sử dụng chất dẫn. Trong nhóm được điều trị 1,875mg/kg sử dụng IV, trong phác đồ dùng thuốc QW, TGI là 41,3-44,7%, giá trị *p* là $< 0,001$. Trong nhóm được điều trị 3,75 mg/kg sử dụng IV, trong phác đồ dùng thuốc QW, TGI là 65,3-65,7% ($p < 0,001$) so với nhóm chất dẫn. 5F9-vcMMAE sử dụng ở hàm lượng 7,5mg/kg IV QW tạo ra giá trị TGI là 84,1-84,3% ($p < 0,001$) và 10mg/kg IV QW (chỉ nghiên cứu B) tạo ra giá trị TGI là 91,2% ($p < 0,001$). Khi 3,75mg/kg được sử dụng IV trong phác đồ dùng thuốc BIW (S), qua sát thấy sự ức chế đáng kể với giá trị TGI là 84,9% ($p < 0,001$).

Quan sát thấy hoạt tính chống khối u vừa phải ở các liều cao hơn của 209-vcMMAE là 7,5 và 10,0mg/kg có giá trị TGI lần lượt là 35,7 và 45,4%, ($p < 0,001$) nhưng ở các mức liều thấp của 209-vcMMAE (1,875 và 3,75 mg/kg) lại biểu hiện không có sự ức chế ($p > 0,05$). Hoạt tính chống khối u do 209-vcMMAE quan sát thấy có khả năng cao là do hoạt tính không đặc hiệu bởi phần MMAE của thể liên hợp miễn dịch.

Việc sử dụng độc tố MMAE tự do sẽ cho các kết quả hỗn hợp: 0,075, 0,135, và 0,15 mg/kg sử dụng IV QW sẽ không ức chế sự phát triển khối u ($p > 0,05$) nhưng sử dụng 0,18mg/kg IV QW sẽ cho kết quả giá trị TGI là 50,4% ($p < 0,001$).

Quan sát thấy sự giảm trọng lượng cơ thể tối đa tốt nhất trong giai đoạn điều trị là 2,3% vào ngày 7 trong nhóm MMAE độc tố tự do 0,18mg/kg của nghiên cứu B và nhóm 5F9-vcMMAE 0,938mg/kg của cùng nghiên cứu. Điều này chỉ ra rằng được chất này được dung nạp tốt.

Việc đo thể tích khối u được tiếp tục trong giai đoạn điều trị cho đến khi thể tích khối u đạt 10% trọng lượng cơ thể ở mỗi con chuột trong nhóm điều trị và sau đó nhóm điều trị được kết thúc. Trong các nghiên cứu này, sự phát triển lại khối u dường như là phụ thuộc vào liều.

Bảng 19. Các kết quả của nghiên cứu A trong điều trị khối u ruột kết sơ cấp của người được cấy ghép ngoại lai ở chuột SCID.

Điều trị	Liều (mg/kg)	Phương pháp sử dụng/tần suất sử dụng	TGI	Sự thay đổi BW (phần trăm tối đa trung bình)	TGD (ngày) / (hoặc ngày cho đến khi khối u đầu tiên $> 1000\text{mm}^3$)
Chất dẫn	0	IV QW $\times$ 3 liều	N/A	-0,2	0
209-vcMMAE	1,875	IV QW $\times$ 3 liều	-2,0 ($p > 0,05$)	8,3	0,6
209-vcMMAE	3,75	IV QW $\times$ 3 liều	4,5 ($p > 0,05$)	6,9	0,4
MMAE	0,075	IV QW $\times$ 3 liều	5,0 ($p > 0,05$)	8,3	1,0
MMAE	0,15	IV QW $\times$ 3 liều	11,1 ($p > 0,05$)	10,8	2,0
5F9-vcMMAE	0,938	IV QW $\times$ 3 liều	21,4 ($p > 0,05$)	9,0	3,3
5F9-vcMMAE	1,875	IV QW $\times$ 3 liều	44,7 ($p > 0,001$)	10,6	8,2
5F9-vcMMAE	3,75	IV QW $\times$ 3 liều	65,3 ($p > 0,001$)	9,0	17,8
5F9-vcMMAE	7,5	IV QW $\times$ 3 liều	84,1 ($p > 0,001$)	7,5	(>58 ngày khối u đầu tiên $> 1000\text{mm}^3$)

Bảng 20. Các kết quả nghiên cứu B trong điều trị khối u ruột kết sơ cấp của người được cấy ghép ngoại lai ở chuột SCID.

Điều trị	Liều (mg/kg)	Phương pháp sử dụng/tần suất sử dụng	TGI	Sự thay đổi BW (phần trăm tối đa trung bình)	TGD (ngày) /(hoặc ngày cho đến khi khối u đầu tiên >1000 mm ³)
Chất dẫn	0	IV QW × 3 liều	N/A	-1,8	0
209-vcMMAE	7,5	IV QW × 3 liều	35,7 (p>0,001)	4,2	4,2
209-vcMMAE	10,0	IV QW × 3 liều	45,4 (p>0,001)	2,6	11,3
MMAE	0,135	IV QW × 3 liều	2,2 (p>0,05)	9,3	0,2
MMAE	0,18	IV QW × 3 liều	50,4 (p>0,001)	-2,3	8,6
5F9-vcMMAE	0,938	IV QW × 3 liều	20,7 (p>0,001)	-2,3	3,8
5F9-vcMMAE	1,875	IV QW × 3 liều	41,3 (p>0,001)	5,6	6,6
5F9-vcMMAE	3,75	IV QW × 3 liều	65,7 (p>0,001)	-2,2	16
5F9-vcMMAE	3,75	IV BIW x 6 liều	84,9 (p>0,001)	-1,8	31,9
5F9-vcMMAE	7,5	IV QW × 3 liều	84,3 (p>0,001)	6,5	(>47 ngày khối u đầu tiên)
5F9-vcMMAE	10,0	IV QW × 3 liều	91,2 (p>0,001)	7,2	(>56 ngày khối u đầu tiên)

Nghiên cứu hiệu quả thử nghiệm (pilot) với kháng thể kháng hGCC 5F9 trần trong mô hình phân tán CT26 hGCC/luc #32 (chuột balb/c)

Mô hình này thử nghiệm khả năng của các kháng thể trần có thể gắn kết với tế bào khối u biểu hiện GCC trong tuần hoàn và ngăn cản sự hình thành các khối u mới. Chuột cái balb/c được tiêm chủng vào trong tĩnh mạch các tế bào CT26 hGCC/luc #32 ở liều 1×10^5 /chuột và 5×10^5 /chuột. Chất dẫn 0,9% NaCl và kháng thể không đặc hiệu (209 trần) được sử dụng làm nhóm đối chứng để so sánh với việc sử dụng 5F9 trần. Cả hai kháng thể được thiết kế (trong vector pLKTOK58) là có isotyp IgG1, khiến cho vùng Fc của chúng có thể gây ra đáp ứng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể sau khi gắn kết với các kháng nguyên bề mặt tế bào (tức là, GCC đối với 5F9 và đích không liên quan đối với 209). Việc dùng thuốc được bắt đầu một ngày trước khi chủng ngừa trong tĩnh mạch, với phác đồ dùng thuốc là một lần/tuần trong tĩnh mạch x4 (q7d x 4). Sự phát triển khối u được kiểm soát bằng hệ thống chụp ảnh Xenogen hai lần một tuần. Trọng lượng cơ thể và tỷ lệ sống sót cũng được kiểm

soát hai lần một tuần. Trọng lượng phổi và các ảnh bao gồm ảnh MRI được chụp khi kết thúc nghiên cứu này.

Như được thể hiện trong Fig. 2, cả hai nhóm 5F9 (40mg/kg và 10mg/kg; 1×10^5 /chuột) đều thể hiện hiệu quả (vào ngày 34p.i: T/C (nhóm xử lý/đối chứng) là 0,04 đến 0,05). T/C đối với nhóm 5F9 là 0,18 đến 0,14 vào ngày 34p.i so với nhóm 209. T/C đối với nhóm 209 40mg/kg là 0,64 so với nhóm NaCl 0,9% (nước muối bình thường). Không quan sát thấy hiệu quả nào với 5F9 trong nhóm 5×10^5 .

Trọng lượng của phổi ở mỗi nhóm khi kết thúc nghiên cứu được trình bày trong Fig. 3. Thử nghiệm T: chất dẫn so với 209 40mg/kg $P=0,4$; chất dẫn so với 5F9 40mg/kg $P<0,05$; chất dẫn so với 5F9 10mg/kg $P<0,01$. Quan sát bằng mắt thường các lá phổi khẳng định rằng ít các cục u hơn trong các nhóm được điều trị bằng 5F9 so với nhóm chất dẫn hoặc nhóm được điều trị bằng 209. MRI *in vivo* của chuột thể hiện sự thoát khối u trong phổi ở tất cả các mô xung quanh và sự chuyển dịch ra lồng ngực trong nhóm chuột được điều trị bằng chất dẫn. Ở chuột được điều trị bằng 5F9 40mg/kg, sự thể hiện phổi bình thường được quan sát thấy mà không có dấu vết của khối u.

Đường cong sống sót được thể hiện trong Fig. 4. Sự tăng lên có ý nghĩa của tỷ lệ sống sót với các nhóm được điều trị bằng 5F9 (1×10^5) được quan sát thấy và không có sự khác biệt giữa các nhóm 5F9 10 và 40 mg/kg.

Ví dụ 4: Tạo ra dòng tế bào sinh kháng thể

Để tạo ra dòng vô tính tế bào CHO ổn định biểu hiện 5F9 với hiệu suất $>600\text{mg/L}$, vector biểu hiện đối với 5F9 được tạo ra bằng cách tách dòng phụ vùng biến đổi chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:19) và vùng biến đổi chuỗi nặng (SEQ ID NO:17) vào trong vector biểu hiện pLKTOK58, chứa IgG1 Fc WT của người và gen kháng neomycin. Sự biểu hiện của sản phẩm dung hợp vùng biến đổi 5F9 -IgG1 trong điều kiện kiểm soát trình tự khởi đầu EF-1a.

Tách dòng và xác định trình tự vùng biến đổi kháng thể đơn dòng 5F9 kháng GCC của người

ARN tổng số được phân tách (Qiagen's RNeasy kit) từ thể lai 46.5F9 của người dòng vô tính phụ 8.2. Thể lai này mang vùng hằng định Kapa được công bố “chuẩn”

của chuỗi nhẹ (Số đăng ký tại Ngân hàng gen # AW383625, hoặc BM918539) và vùng hằng định IgG2 được công bố “chuẩn” của chuỗi nặng (Số đăng ký tại Ngân hàng gen # BX640623, hoặc AJ294731). Các cADN đuôi poly-G theo chiều 5’ (5’ race-ready, poly-G tailed cDNA), được tổng hợp bằng các phương pháp truyền thống (Nature Methods 2, 629-630 (2005)). Vùng biến đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng phương pháp PCR từ cADN bằng cách chạy theo chiều 5’ bằng oligo neo poly-C kết hợp với đoạn môi ngược đặc hiệu với vùng hằng định Kapa. Vùng biến đổi chuỗi nặng được khuếch đại bằng đoạn môi ngược đặc hiệu với vùng hằng định IgG2 trong nhiều hỗn hợp với các đoạn môi xuôi đặc hiệu với trình tự dẫn đầu chuỗi nặng đã biết. Các sản phẩm PCR được tách dòng TOPO® (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) và xác định trình tự bằng các đoạn môi M13F và M13R.

Xây dựng cấu trúc của vector biểu hiện của động vật có vú mang kháng thể 5F9 kháng GCC đơn dòng của người

Vector biểu hiện của động vật có vú mang vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng 5F9 được tạo cấu trúc để sản xuất dòng tế bào CHO. Đối với cấu trúc tự nhiên này, vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ 5F9 được tách dòng phụ vào pLKTOK58D (Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20040033561). Vector này mang hai gen đánh dấu chọn lọc của động vật có vú: gen kháng neomycin và DHFR/metotrexat (để khuếch đại). Vector này cho phép sự đồng biểu hiện của cả hai chuỗi nặng và nhẹ từ các trình tự khởi đầu EF1 alpha nối tiếp, mỗi đoạn ngược dòng được đặt vị trí của vùng hằng định gen dẫn đầu-Kapa và vùng hằng định gen dẫn đầu-IgG1 của vector (Fc kiểu đại). Để tách dòng phụ, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được khuếch đại PCR từ các dòng vô tính TOPO đã được xác định trình tự bằng các đoạn môi đặc hiệu gen chứa các vị trí giới hạn duy nhất để tách dòng định hướng vào các đoạn nối của vùng dẫn đầu-Kapa và dẫn đầu-IgG1 tương ứng của vector này. Các trình tự của các đoạn môi là như sau (các trình tự đặc hiệu với vùng biến đổi 5F9 ở dạng in đậm):

Các đoạn môi biến đổi – đoạn dẫn đầu của chuỗi nhẹ 5F9 tự nhiên:

NotI xuôi

5’ ataagaatGCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA
CAGCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG-
 3’ (SEQ ID NO: 234)

BsiWI ngược

5'- GCCACCGTACGTTTGATTTCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC-3' (SEQ ID NO:235)

Các đoạn môi biến đổi – đoạn dẫn đầu của chuỗi nhẹ 5F9 tự nhiên

EcoRI xuôi

5'ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACA
GCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC-3'
(SEQ ID NO:236)

BlnI ngược

5'-GGAGGCTGAGCTGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGTGGTC-3'
(SEQ ID NO: 237)

Các dòng vô tính được khẳng định bằng việc xác định trình tự ADN sợi kép của cả hai chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

Hai phương pháp chuyển nhiễm được sử dụng để đưa các cấu trúc vào trong tế bào CHO: quy trình MPI truyền thống và quy trình Crucell. Sự chuyển nhiễm tế bào CHO được bắt đầu bằng cấu trúc 5F9 tự nhiên bằng quy trình MPI truyền thống. Các ADN duỗi thẳng và không duỗi thẳng được sử dụng, với phương pháp điện chuyển hoặc chuyển nhiễm Lipopfectamin 2000 CD. Khoảng 30 nhóm ổn định được tạo ra qua việc lựa chọn trong G418, môi trường không nucleosit và metotrexat 5nM. Dựa vào việc phân tích FMAT mức sinh kháng thể, ba nhóm ổn định được chọn để tách dòng. Nhóm này có sự tạo ra cao nhất các kháng thể được tiết ở nồng độ 12,2ug/ml. Ba nhóm này được làm đông lạnh.

Các yếu tố Crucell STAR có thể được đánh giá để tạo ra vector biểu hiện 5F9 chứa yếu tố STAR.

Trình tự nucleotit chuỗi nặng 5F9/hIgG1 là:

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGT
GTCCACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACC
CTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCC
GCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAACACC
AACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCA

GTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAG
 AGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
 CAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC
 CTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
 GGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA
 GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC
 CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG
 TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
 TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCC
 GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
 GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT
 GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
 TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
 CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC
 CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAACAGGGT
 AATACTAGAG

(SEQ ID NO:230)

Trình tự protein chuỗi nặng 5F9/hIgG1 là;

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVFGGSFSGYYWSWIRQPPGK
 GLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGN
 FDHWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREĐƯƠNG
 LƯỢNGYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPL
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:231)

Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ 5F9/hKapa là:

GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAG
 GTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGG
 AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCCTGGTATC

AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTG
 GAATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCGGCA
 GCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGA
 CGTTCGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA
 TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
 TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
 GTAACCTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
 AGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT
 CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTC
 TAGA

(SEQ ID NO:232)

Trình tự protein chuỗi nhẹ 5F9/hKapa là:

MGWSCILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK
 PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQYKTPRTFGQGTN
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDĐUÔNG
 LƯỢNGLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTĐUÔNG
 LƯỢNGDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO:233)

Trình tự axit nucleic chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 5F9 nêu dưới đây được chèn
 vào trong vector pTOK58D:

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgaaatagtgatgacgcagctccagccaccctgt
 gtgtctccagg
 ggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagaaacttagcctggtatcagcagaaacctggccagg
 ctcccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggaatcccagccaggttcagtggcagtggtctgggaca
 gagttcactctcaccatcggcagcctgcagctgaagatcttcagtttattactgtcagcagtataaacctggcctcg
 gacgttcggccaagggaaccaacgtggaaatcaaacgtacggtggctgcacatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
 agcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaa
 gtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcag
 cagcacctgaccctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagct
 cgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO:308)

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggttagcaacagct
acaggtgtccactcccaggtgcagctacagcagtggggcgaggactgtgaagccttcggagaccctgtccctcacctg
cgctgtctttggtgggtctttcagtggttactactggagctggatccgccagccccaggggaaggggctggagtggattg
gggaaatcaatcatcgtggaaacaccaacgacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaag
aaccagttcgccctgaagctgagttctgtgaccgccgaggacacggctgtttattactgtgcgagagaacgtggatacac
ctatggtaactttgaccactggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccatcggtcttcc
ccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccg
gtgacgggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactcta
ctccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgaacgtgaatcacaagccca
gcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaactctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaa
ctcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcac
atgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatg
ccaagacaaagccgaggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg
ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaa
agggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gcttggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc
acgctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg
gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggta
aataa (SEQ ID NO:309)

Các trình tự mã hóa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Abx-229 sau đây được
chèn vào trong vectơ pTOK58D:

atggagtttgggctgagctggcttttcttgggtatt
ttaaaggtgtccagtgtgaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctc
ctgtgcagcctctggattcacctttagccgctatgccatgaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggg
tctcaggtattagtgggagtggtggtaggacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaat
tccaagaacacactatatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaagatcgcgga

tttttgagtggtccatttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaaggggcccatcgg
tctccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtaaggactacttcccc
gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcagg
actctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaca
agcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgacaaaactcacacatgccaccgtgccagca
cctgaactcctggggggaccgtcagttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaacctga
ggtcacatgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgc
ataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca
g
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaa
agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcag
cc
tgacctgcctggtaaaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac
aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca
gcaggggaacgtcttctcatgtcctgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtaaataa (SEQ ID NO:310)

atgaggctccctgctcagcttctc
ttctctctgctactctggctcccagataccactggagaaatagtgtgacgccgtcttcagccaccctgtctgtgtctcc
aggggagagagccaccctctctgcagggccagtcagagtgttagtagaaacttagcctggtaccagcagaaacctggcc
aggctcccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggatatccagccagggtcagtggcagtggggtctggg
acagaattcactctcacatcagcagcctgcagctctgaagattttgcagtttattactgtcaccagtatagtaactggat
gtgcagttttggccagggggaccaagctggagatcaaacgtacgggtggctgcacatctgtcttcatcttcccgcctctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgg
aagggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcc
t

21857

cagcagcaccctgaccctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctg
a

gctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO:311)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử kháng thể kháng GCC, chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa ba vùng xác định hỗ trợ của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, và LCDR3) và vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa ba vùng xác định hỗ trợ của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2, và HCDR3),

trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO:112, LCDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO:114, và LCDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO:116; và

trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO:106, HCDR2 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO:108, và HCDR3 chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO:110.

2. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa thêm các vùng khung biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người hoặc thu được từ người.

3. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phân tử kháng thể kháng GCC này là kháng thể IgG1.

4. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 20 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

5. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phân tử kháng thể kháng GCC này không được liên hợp với chất điều trị.

6. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phân tử kháng thể kháng GCC này được liên hợp với chất điều trị, nhãn phát hiện được, nhãn phóng xạ điều trị hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

7. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phân tử kháng thể kháng GCC này chứa vùng Fc, trong đó vùng Fc này chứa đột biến.
8. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phân tử kháng thể kháng GCC này là phân tử kháng thể đặc hiệu kép.
9. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 8, trong đó phân tử này chứa hai phân tử kháng thể, một phân tử có tính đặc hiệu liên kết với GCC và phân tử còn lại có tính đặc hiệu liên kết với phân tử thứ hai.
10. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 9, trong đó hai phân tử kháng thể được liên hợp với nhau.
11. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 8, trong đó phân tử này chứa phân tử kháng thể đơn mà chứa một chuỗi có tính đặc hiệu liên kết với GCC và chuỗi thứ hai có tính đặc hiệu liên kết với phân tử thứ hai.
12. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 8, trong đó phân tử này chứa phân tử kháng thể chuỗi đơn có tính đặc hiệu liên kết với GCC và phân tử thứ hai.
13. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 6, trong đó nhãn phóng xạ điều trị chứa nguồn hạt α hoặc nguồn hạt β .
14. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 13, trong đó nguồn hạt α là ^{213}Bi hoặc ^{225}Ac hoặc trong đó nguồn hạt β là ^{90}Y hoặc ^{177}Lu .
15. Phân tử kháng thể mà liên kết với cùng epitop trên GCC với phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 1.

16. Phân tử kháng thể theo điểm 15, trong đó phân tử kháng thể này liên kết với đoạn chứa các gốc axit amin từ 1 đến 50 của SEQ ID NO: 228.

17. Phân tử kháng thể theo điểm 15 hoặc 16, trong đó phân tử kháng thể này liên kết với đoạn chứa các gốc axit amin từ 25 đến 50 của SEQ ID NO: 228.

18. Phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 17, trong đó phân tử kháng thể này liên kết với đoạn chứa các gốc axit amin từ 35 đến 50 của SEQ ID NO: 228.

19. Phân tử kháng thể theo điểm 15, trong đó phân tử kháng thể này liên kết với đoạn chứa các gốc axit amin từ 24 đến 420 của SEQ ID NO: 228.

20. Phân tử kháng thể theo điểm 15 hoặc 19, trong đó phân tử kháng thể này liên kết với đoạn chứa các gốc axit amin từ 24 đến 75 của SEQ ID NO: 228.

21. Phân tử kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với GCC với phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 1.

22. Thể liên hợp miễn dịch có công thức (I):



hoặc muối được dụng của nó, trong đó:

Ab là phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21;

X là gốc liên kết mà kết nối Ab và Z;

Z là chất điều trị hoặc nhãn điều trị; và

m là số gốc -X-Z trong mỗi phân tử kháng thể kháng GCC trong thể liên hợp miễn dịch có công thức (I); và m là số nguyên từ 1 đến 15.

23. Thở liên hợp miễn dịch theo điểm 22 hoặc muối được dụng của nó, trong đó Z là nhãn phát hiện được, maytansine, auristatin, N^{2'}-deaxetyl-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine (DM1), N^{2'}-deaxetyl-N^{2'}-(4-mercapto-4-metyl-1-oxopentyl) maytansine (DM4), monometyl auristatin E (MMAE), monometyl auristatin F (MMAF), hoặc tác nhân kìm hãm tế bào hoặc gây độc tế bào.

24. Thở liên hợp miễn dịch theo điểm 22 hoặc muối được dụng của nó, trong đó Z là nhãn phóng xạ điều trị.

25. Thở liên hợp miễn dịch theo điểm 24 hoặc muối được dụng của nó, trong đó nhãn phóng xạ điều trị chứa nguồn hạt α hoặc nguồn hạt β .

26. Thở liên hợp miễn dịch theo điểm 25 hoặc muối được dụng của nó, trong đó nguồn hạt α là ²¹³Bi hoặc ²²⁵Ac hoặc trong đó nguồn hạt β là ⁹⁰Y hoặc ¹⁷⁷Lu.

27. Thở liên hợp miễn dịch theo điểm 23, trong đó tác nhân kìm hãm tế bào hoặc gây độc tế bào được chọn từ các chất chống chuyển hóa, tác nhân alkyl hóa, anthracyclin, chất kháng sinh, chất chống nguyên phân, chất ức chế topoisomeraza, hoặc chất ức chế proteasom.

28. Thở liên hợp miễn dịch theo điểm 27, trong đó:

chất chống chuyển hóa được chọn từ azathioprin, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, fludarabin, pentostatin, cladribin, 5-flouraxil (5-FU), floxuridin (FUDR), xytosin arabinosid (cytarabin), methotrexat, trimethoprim, pyrimethamin, và pemetrexed;

tác nhân alkyl hóa được chọn từ xyclophosphamid, mechlorethamin, uramustin, melphalan, chlorambucil, thiotepa/chlorambucil, ifosfamid, carmustin, lomustin, streptozocin, busulfan, dibromomannitol, cisplatin, carboplatin, nedaplatin, oxaliplatin, satraplatin, triplatin tetranitrat, procarbazin, altretamin, dacarbazin, mitozolomid, hoặc temozolomid;

anthraxycin được chọn từ daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, hoặc valrubicin;

chất kháng sinh được chọn từ dactinomycin, bleomycin, mithramycin, anthramycin, streptozotocin, gramicidin D, mitomycin, duocarmycin, hoặc calicheamicin;

chất chống nguyên phân được chọn từ maytansinoid, auristatin, dolastatin, cryptophycin, vinca alkaloid, taxane, hoặc colchicine;

chất ức chế topoisomeraza được chọn từ irinotecan, topotecan, amsacrin, etoposid, teniposid, hoặc mitoxantron; hoặc

chất ức chế proteasom là axit peptidyl boronic.

29. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 28, trong đó:

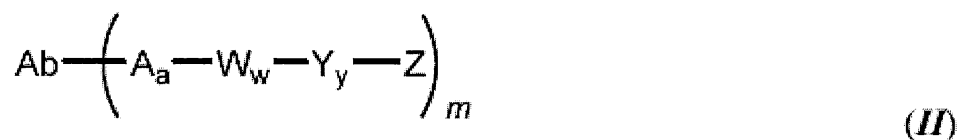
mitomycin là mitomycin C;

duocarmycin là CC-1065;

taxan là paclitaxel hoặc docetaxel; hoặc

vinca alkaloid được chọn từ vincristin, vinblastin, vindesin, hoặc vinorelbin.

30. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 22, trong đó gốc liên kết X có công thức -Aa-Ww-Yy-, và thể liên hợp miễn dịch này có công thức (II):



hoặc muối được dụng của nó, trong đó

-A- là đơn vị kéo dài;

a là 0 hoặc 1;

mỗi -W- độc lập là đơn vị axit amin;

w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12;

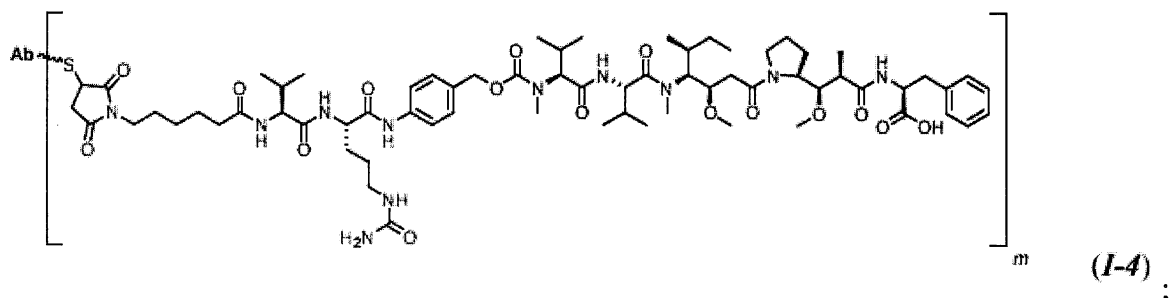
-Y- là đơn vị đệm tự phân huỷ;

y là 0, 1, hoặc 2;

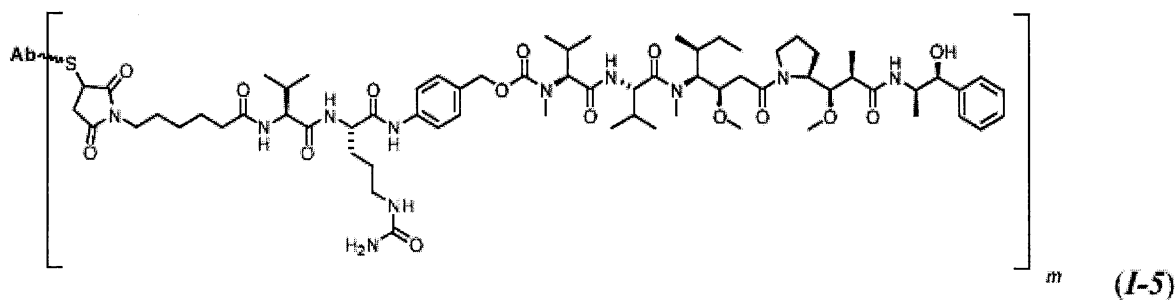
Z là chất điều trị hoặc nhãn điều trị; và

m là số nguyên từ 1 đến 15.

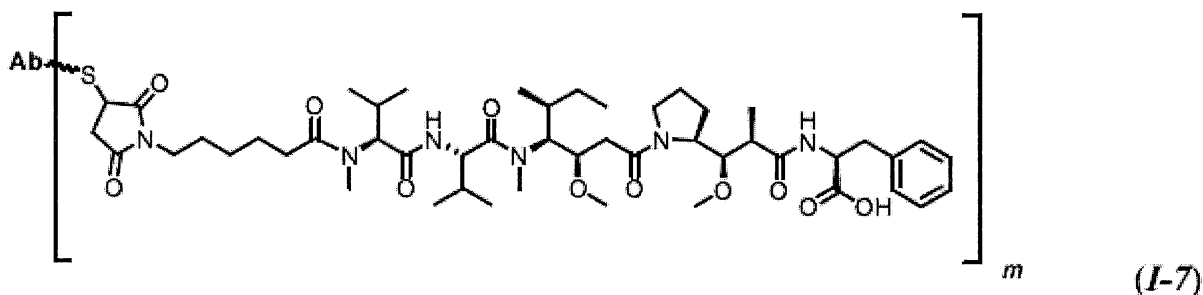
31. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 22, trong đó thể liên hợp miễn dịch này có công thức (I-4):



công thức (I-5):



hoặc công thức (I-7):



hoặc muối được dụng của nó, trong đó

m là số nguyên từ 1 đến 8.

32. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 31 hoặc muối được dụng của nó, trong đó m nằm trong khoảng từ 1 đến 3.

33. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 31 hoặc muối được dụng của nó, trong đó m nằm trong khoảng từ 3 đến 5.

34. Chế phẩm điều trị chứa phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21 hoặc thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 33 hoặc muối được dụng của nó để điều trị rối loạn cho đối tượng.
35. Axit nucleic được phân lập mã hóa phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
36. Axit nucleic được phân lập mã hóa vùng biến đổi của phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
37. Axit nucleic được phân lập theo điểm 35 hoặc 36, trong đó axit nucleic này chứa trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 17 và/hoặc SEQ ID NO: 19.
38. Tế bào chứa axit nucleic được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 35 đến 37.
39. Phương pháp sản xuất phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, bao gồm bước nuôi cấy tế bào theo điểm 38 trong các điều kiện cho phép tạo ra phân tử kháng thể, nhờ đó sản xuất phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
40. Vektor chứa một hoặc cả hai vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
41. Phương pháp in vitro phát hiện phân tử GCC bao gồm bước cho phân tử này tiếp xúc với phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 và xác định xem phân tử kháng thể đã nêu có liên kết với phân tử GCC đã nêu hay không.
42. Dược phẩm chứa phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21 và chất mang được dụng.

43. Dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 33 và chất mang dược dụng.
44. Dược phẩm theo điểm 43, trong đó dược phẩm này chứa nhiều thể liên hợp miễn dịch có công thức (I), trong đó hai hoặc nhiều thể liên hợp miễn dịch này có trị số m khác nhau.
45. Dược phẩm theo điểm 43, trong đó dược phẩm này chứa nhiều thể liên hợp miễn dịch có công thức (I), trong đó m là số gốc -X-Z trung bình trong một phân tử kháng thể kháng GCC.
46. Dược phẩm theo điểm 45, trong đó m là số nguyên bằng 4.
47. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 44 đến 46, trong đó dược phẩm này chứa nhiều thể liên hợp miễn dịch có công thức (I-5).
48. Vật chứa chứa dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 42 đến 47.
49. Kit để phát hiện phân tử GCC hoặc ức chế sự sinh trưởng của các tế bào biểu hiện GCC chứa phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21 hoặc thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 33.
50. Chế phẩm điều trị chứa phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 để phát hiện phân tử GCC, trong đó phân tử GCC được phát hiện nếu phân tử kháng thể trong chế phẩm này được xác định là liên kết với phân tử GCC đã nêu.

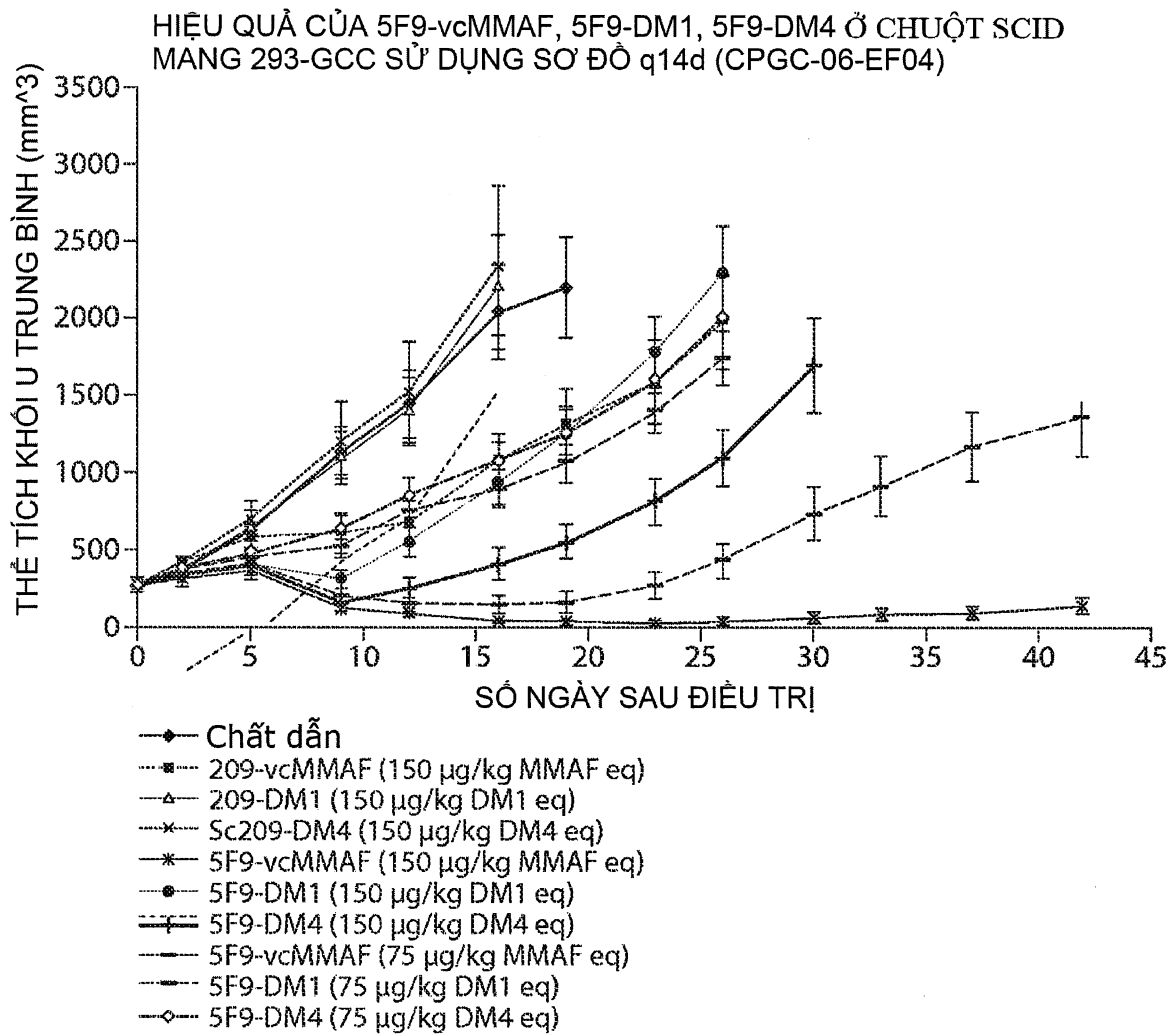


Fig. 1

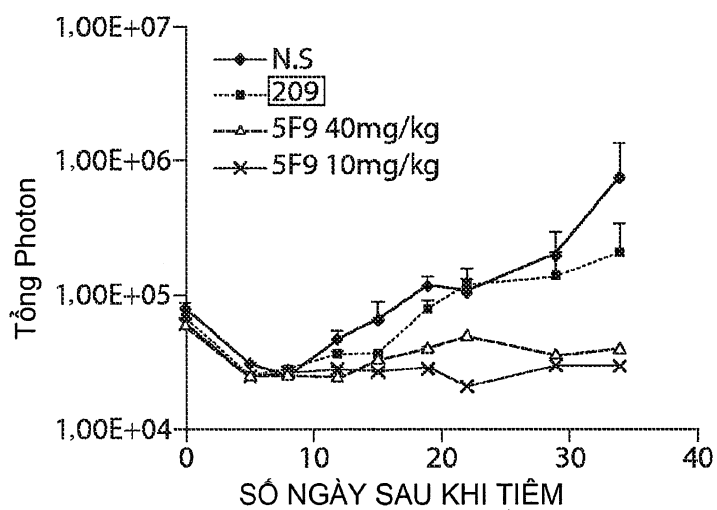


Fig. 2

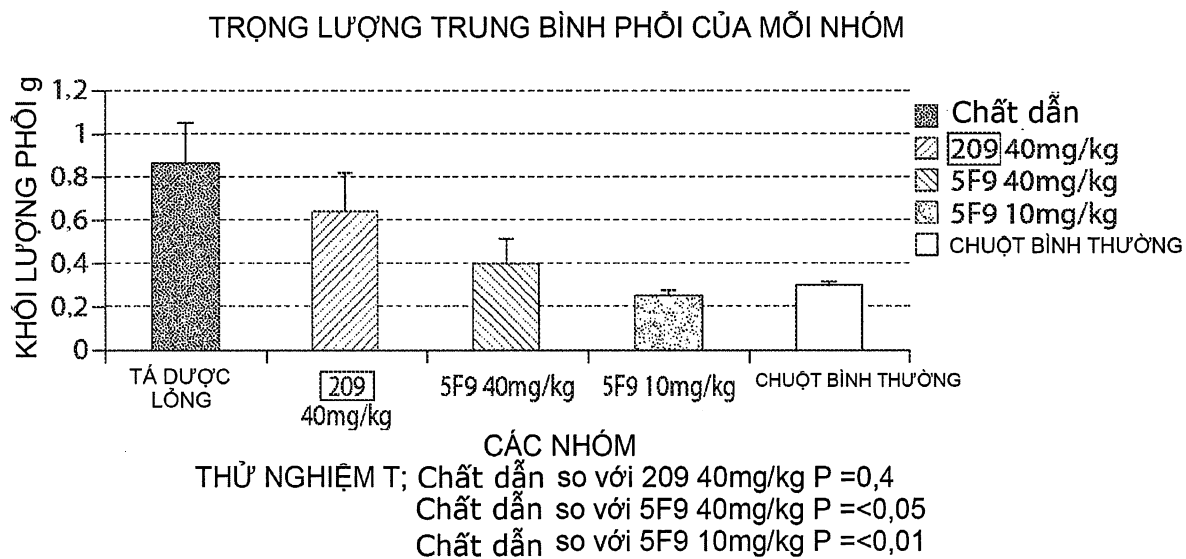


Fig. 3

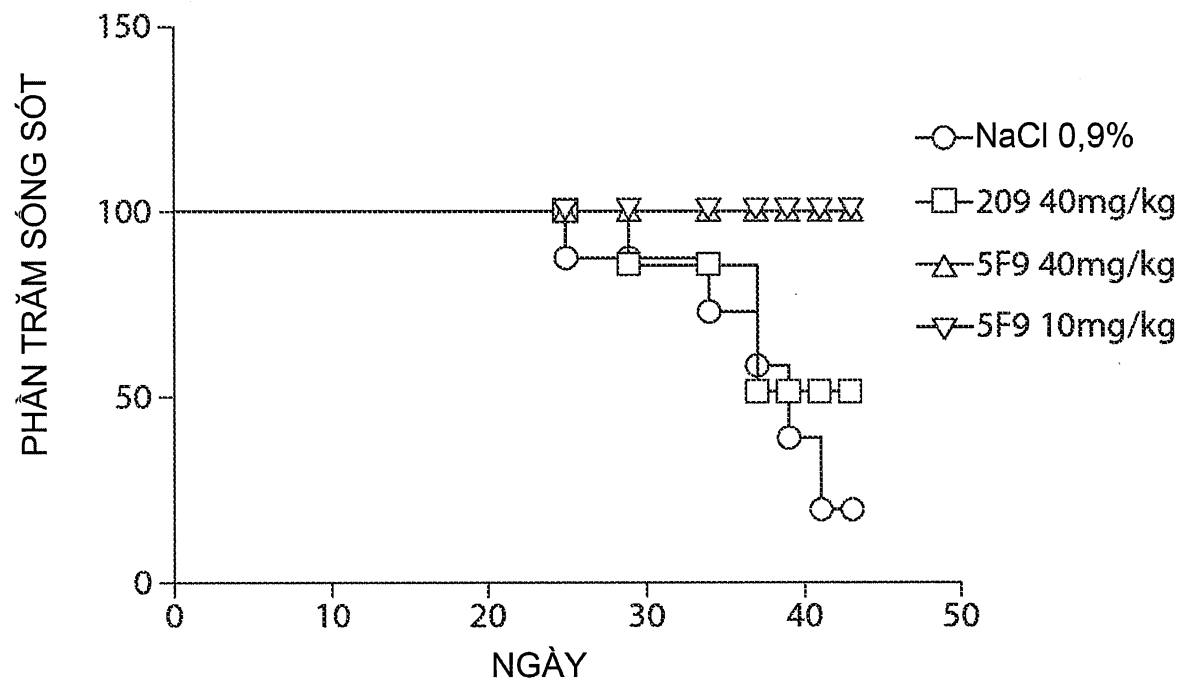


Fig. 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
AMGEN BRITISH COLUMBIA INC.

<120> PHÂN TỬ KHÁNG THỂ KHÁNG GUANYLYL XYCLAZA C (GCC) VÀ DUỐC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ KHÁNG THỂ NÀY

<130> M2051-7027WO

<140>

<141>

<150> 61/254,474

<151> 2009-10-23

<160> 319

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 348

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 1

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc	60
acatgcactg tctctggggt ctcattaagc agaaatgcta taagctgggt tgcgcagcca	120
ccaggaaagg gtctggagtg gcttggagta atatggactg gtggaggcac aaattataat	180
tcagctctca aatccagact gagcatccgc aaagagaact ccaagagtca agttttctta	240
aaaatgaaca gtctacaaac tgaagacaca gccaggtact tctgtgccag aagtgggttac	300
gacggggttg attactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca	348

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 2

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

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Glu Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 3
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 3
cagattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaaat tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120
acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cctgtctgcg 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcaccagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtggttaacc cgtacacgtt cggagggggg 300
accaaactgg aaataaaa 318

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 4
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 5
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 5
caggtccagt tgaagcagtc tggagctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gactactata taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gccttgagtg gattggaaag attggctctc gaagtggtaa tacttactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcgtccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatgggat 300
gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctct 336

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 6
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

<210> 7

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 7

gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcgggta ccattggaca accagcctct 60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tataagtaatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttacaacaga ggcttgcca ggctccaaag cacctaattgt atcaggtgtc caaactggac 180

cctggcatcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc 240

agcagagtgg aggctgaaga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac atattatccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaag 336

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 8

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Ile Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

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

<210> 9

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 9

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgcagatg 60
tcttgtaagg cttctggcta tattttcacc ggctactgga tgtactgggt gaagcagagg 120
cctggccaag gccttgagtg gattggaagg attcatcctt ctgatagtaa tactaactac 180
aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac ccatgcctt 300
gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctct 336

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 10.

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Thr His Ala Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

<210> 11
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 11
 gatgttggtg tgaccagac tccactcact ttgtcgatta ccattggaca accagcctct 60
 atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtaatg gaaaaaccta tttgagttgg 120
 ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactt atctggtgtc tcaactggac 180
 tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtg tattactgcg tgcaaggtac acatttattc 300
 acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaa 333

<210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

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

<210> 13
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 13
 caggtccagc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca gactactata taaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gccttgagtg gattggaaag attggctcta gaagtggtag tacttactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatgggat 300
 gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctctgca 339

<210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

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

<210> 15
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 15
 gatgttgatga tgaccagac tccactgtct ttgtcggta ccattggaca accagcctct 60
 atctcttgca agtcaagtca ggcctctta tatagtaatg gaaagacata tttgaattgg 120
 ttacaacaga ggctggcca ggctccaaag cacctaattgt atcaggtgtc caaactggac 180
 cctggcatcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgaaga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac atattatccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 16
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 16
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
 35 40 45
 Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Ile Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 17
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 17

```

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc      60
acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc      120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caacgacaac      180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccttg      240
aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgagag agaacgtgga      300
tacacctatg gtaactttga ccactggggc caggggaacc tggtcacctg ctccctca      357

```

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 18

```

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

```

```

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

```

```

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35              40              45

```

```

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

```

```

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ala Leu
65              70              75              80

```

```

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

```

```

Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
          100              105              110

```

```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 19

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 19

```

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agaaacttag cctgggtatca gcagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg aatcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcggcag cctgcagtct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataaaacct ggcctcggac gttcggccaa      300
gggaccaacg tggaaatcaa a                                              321

```

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 20

```

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

```

```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
          20          25          30

```

```

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

```

```

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser Leu Gln Ser
65          70          75          80

```

```

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg
          85          90          95

```

```

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

```

<210> 21

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 21
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtcaagc ctggaggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactgctaca tgagctggat cgcgcagtct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attactacta gtggtaatac catttactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagactgg 300
 ggatggttct acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctctca 357

<210> 22
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Cys
 20 25 30

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

Ser Tyr Ile Thr Thr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Trp Gly Trp Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 23
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<220>

<221> bazo cải biến

<222> (216)..(217)

<223> a, c, t, g, không rõ hoặc khác

<400> 23

```

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc      60
atctcctgca agtctagtca ggcctcctg cataatgatg gaaagaccta tttgtattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacaa ctctgatct atgaagtttc caaccggttc      180
tctggagtgc cagatagggt cagtagcagc gggctcnnnga cagatttcac actgaaaatc      240
agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct      300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa                                336

```

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (73)..(73)

<223> Axit amin bất kỳ

<400> 24

```

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

```

```

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn
                20              25              30

```

```

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

```

```

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

```

```

Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Xaa Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65              70              75              80

```

```

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85              90              95

```

```

Ile Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100             105             110

```

<210> 25
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 25
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt cgcgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggagg 300
 agcagctcgt actttgacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 27
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagacttc taaccgcttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg gagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca 300
 accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa 333

<210> 28
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 28
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 29
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 29

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgggagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat      180
gcagcctccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtat ttactgtgc gagagggagg      300
agcagctcgt attttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca          354

```

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 30

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                20              25              30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35              40              45

Gly Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
                50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
        65              70              75              80

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

Ala Arg Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser
                115

```

<210> 31

<211> 333

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 31

```

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgga ggcggcctcc      60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg      120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagacttc taaccgcttc      180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc      240
agcaggggtgg gagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca      300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa                                  333

```

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 32

```

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

```

```

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20           25           30

```

```

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35           40           45

```

```

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

```

```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80

```

```

Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85           90           95

```

```

Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 33

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 33
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggagg 300
 agcagctcgt actttgacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 34
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 35
gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
ttctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacacgta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccgggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcca 300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa 333

<210> 36
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 36
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Phe Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 37
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 37
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg gatttcatac attactagta gtggtagtag catatactac 180
 tcagcctctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatttc 300
 agtggctggg tcggagtcga ctttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360
 tcg 363

<210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Tyr Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Phe Ser Gly Trp Phe Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 39
 gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgta agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 180
 tctggagtgc caaatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acaacttacg 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 40

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95

Ile Gln Leu Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 41

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 41

gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggactg ggtctcagat attagtggta gtgggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaattgc acagcctgag cgccgaggac acggccatat attactgtgc gaaacggcgg 300
 tggcaggggt acttcgatct ctggggccgt ggcaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 42
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 42
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45

Ser Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met His Ser Leu Ser Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Arg Arg Trp Gln Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 43
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 43
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccaggca gcgtgttgac agcaggtact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct cactttcggc 300
 ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 44
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Arg Gln Arg Val Asp Ser Arg
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 45
 gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc cgctatgccca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggga gtggtggtag gacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactatat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300

gatttttggg gtgggtccatt tgactactgg ggccagggaa ccttggtcac cgtctcctca 360

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 46

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 47

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga gagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagggttagt agaaacttag cctgggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcaccag tatagtaact ggatgtgcag ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a

321

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 48

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Pro	Ser	Ser	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Arg	Asn
			20					25					30		

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

Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Ser	Asn	Trp	Met	Cys
				85					90					95	

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

<210> 49

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 49

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcaga agttactact ggagctggat ccggcagccc	120
gccgggaagg gactggagtg gattggacgt atttatatca gtgggaggac caccttcaac	180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtggacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt tctgtgagag agatagatat	300
tatggctacc ttgactactg gggccagga accctggtca ccgtctcctc a	351

<210> 50
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 50
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Thr Phe Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 51
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc cgcagttact tagcctggta ccaacagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacagggtca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcaccgag caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 52
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 52
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

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

<210> 53
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 53
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggcgg ctccatccgt cattactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccaggggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
 ctctccctca agagtcgagt caccatatca agagacacgt ccaagaatca ggtctccctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcggc gggatatgggc 300
 tttgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342

<210> 54
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 54

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg His Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Leu Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80

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

Ala Gly Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 55

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 55

gacatccaga tgaccagtc tccttcctcc ctgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca ggccattaga aatgatttag gctggtatca gctgaaaccg 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctattct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaggattctg caacttatta ctgtctacag cataatagtt tccctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

<210> 57

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 57

agaaatgcta taagc

15

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 58

Arg Asn Ala Ile Ser
 1 5

<210> 59

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 59

gtaatatgga ctggtggagg cacaaattat aattcagctc tcaaattcc

48

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 60

Val	Ile	Trp	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser
1				5				10					15		

<210> 61

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 61

agtggttacg acgggtttga ttac

24

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 62

Ser	Gly	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asp	Tyr
1				5			

<210> 63

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 63

agtgccagct caagtgtaaa ttacatgcac

30

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 64

Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
1 5 10

<210> 65

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 65

gacacatcca aactggcttc t

21

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 66

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 67

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 67

cagcagtgga gtggtaaccc gtacacg

27

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 68

Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 69

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 69

gactactata taaac

15

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 70

Asp Tyr Tyr Ile Asn

1

5

<210> 71

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 71

aagattggtc ctcgaagtgg taatacttac tacaatgaga agttcaaggg c

51

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 72

Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 73

<211> 12

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 73

tgggatgctt ac

12

<210> 74

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 74

Trp Asp Ala Tyr

1

<210> 75

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 75

aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat atttgaat

48

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 76

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1

5

10

15

<210> 77

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 77

caggtgtcca aactggaccc t

21

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 78

Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro

1

5

<210> 79

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 79

ttgcaaggta catattatcc gtacacg

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 80

Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 81

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 81

ggctactgga tgtac

15

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 82

Gly Tyr Trp Met Tyr

1

5

<210> 83

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 83

aggattcatc cttctgatag taataactaac tacaatcaaa agttcaaggg c

51

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 84

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

Gly

<210> 85

<211> 12

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 85

gcccttgctt ac

12

<210> 86

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 86

Ala Leu Ala Tyr

1

<210> 87

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 87

aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaaaacct atttgagt

48

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 88

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Ser
1				5				10						15	

<210> 89
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 89
 ctggtgtctc aactggactc t

21

<210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 90
 Leu Val Ser Gln Leu Asp Ser
 1 5

<210> 91
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 91
 gtgcaaggta cacattttatt cacg

24

<210> 92
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 92
 Val Gln Gly Thr His Leu Phe Thr
 1 5

<210> 93
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 93
 gactactata taaac

15

<210> 94

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 94
 Asp Tyr Tyr Ile Asn
 1 5

<210> 95
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 95
 aagattgggtc ctagaagtggt tagtacttac tacaatgaga agttcaaggg c

51

<210> 96
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 96
 Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 97
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 97
 tgggatgctt ac

12

<210> 98
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 98
 Trp Asp Ala Tyr

1

<210> 99
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 99
 aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat atttgaat

48

<210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 100
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu
 1 5 10 15

<210> 101
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 101
 caggtgtcca aactggaccc t

21

<210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 102
 Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
 1 5

<210> 103
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 103
 ttgcaaggta catattatcc gtacacg

27

<210> 104
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 104
 Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 105
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 105
 gggtactact ggagc

15

<210> 106
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 106
 Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 107
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 107
 gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aaccgcgtccc tcaag

45

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

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 108
 Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 109
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 109
 gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac

33

<210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 110
 Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His
 1 5 10

<210> 111
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 111
 agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcc

33

<210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 112
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 113
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 113
 ggtgcatcca ccagggccac t

21

<210> 114
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 114
 Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 115
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 115
 cagcagtata aaacctggcc tcggacg

27

<210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 116
 Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 117
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 117
 gactgctaca tgagc

15

<210> 118
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 118
 Asp Cys Tyr Met Ser
 1 5

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

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 119
 tacattacta ctagtggttaa taccatttac tacgcagact ctgtgaaggg c

51

<210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 120
 Tyr Ile Thr Thr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 121
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 121
 gactggggat ggttctacgg tatggacgtc

30

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

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 122
 Asp Trp Gly Trp Phe Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 123
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 123
aagtctagtc agagcctcct gcataatgat ggaaagacct atttg

45

<210> 124
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 124
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 125
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 125
gaagtttcca accggttctc t

21

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 126
Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 127
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 127
atgcaaagta tacagcttcc tcggacg

27

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 128

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 129
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 129
agctatggca tgcac

15

<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 130
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 131
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 131
gctatatgggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 132
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 132
Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 133
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 133

gggaggagca gctcgtactt tgactat

27

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 134

Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr

1

5

<210> 135

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 135

aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacct acttgagt

48

<210> 136

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 136

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser

1

5

10

15

<210> 137

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 137

aagacttcta accgcttctc t

21

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 138

Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 139

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 139

atgcaagcta cgcaatttcc aacc

24

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 140

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

<210> 141

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 141

agctatggca tgcac

15

<210> 142

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 142

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 143

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 143

gctatatggg atgatggaag taataaatac tatgcagcct ccgtgaaggg c

51

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 144

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 145

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 145

gggaggagca gctcgtatatt tgactac

27

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 146

Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr

1

5

<210> 147

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 147

aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacct acttgagt

48

<210> 148

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 148

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser
1				5					10					15	

<210> 149

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 149

aagacttcta accgcttctc t

21

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 150

Lys	Thr	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 151

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 151

atgcaagcta cgcaatttcc a

21

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 152

Met	Gln	Ala	Thr	Gln	Phe	Pro	Thr
1				5			

<210> 153

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 153

agctatggca tgcac

15

<210> 154

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 154

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 155

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 155

gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 156

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 156

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 157

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 157

gggaggagca gctcgtactt tgactat

27

<210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 158
 Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 159
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 159
 aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacgt acttgagt

48

<210> 160
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 160
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 161
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 161
 aagatttcta accggttctc t

21

<210> 162
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 162
 Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 163
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 163
 atgcaagcta cacaatttcc aacc

24

<210> 164
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 164
 Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
 1 5

<210> 165
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 165
 gactactaca tgagc

15

<210> 166
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 166
 Asp Tyr Tyr Met Ser
 1 5

<210> 167
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 167
 tacattacta gtagtggtag taccatatac tactcagcct ctgtgaaggg c

51

<210> 168

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

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 168
 Tyr Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 169
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 169
 gatttcagtg gctgggttcgg agtccacttt gactac

36

<210> 170
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 170
 Asp Phe Ser Gly Trp Phe Gly Val His Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 171
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 171
 aagtctagtc agagcctcct gcatagtgat ggaaagacct atttgtat

48

<210> 172
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 172
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1

5

10

15

<210> 173

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 173

gaagtttcca accggttctc t

21

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 174

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 175

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 175

atgcaaagta tacaacttac gtggacg

27

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 176

Met Gln Ser Ile Gln Leu Thr Trp Thr

1

5

<210> 177

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 177

agctatgccca tgagc

15

<210> 178
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 178
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 179
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 179
 gatattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 180
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 180
 Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 181
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 181
 cggcgggtggc aggggtactt cgatctc

27

<210> 182
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 182
 Arg Arg Trp Gln Gly Tyr Phe Asp Leu
 1 5

<210> 183
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 183
 agggccaggc agcgtgttga cagcaggtac ttagcc

36

<210> 184
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 184
 Arg Ala Arg Gln Arg Val Asp Ser Arg Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 185
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 185
 ggtgcatcca gcagggccac t

21

<210> 186
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 186
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 187
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 187
cagcagtatg gtagctcacc gctcact

27

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 188
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 189
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 189
cgctatgccca tgaac

15

<210> 190
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 190
Arg Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 191
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 191
ggattatgtg ggagtgggtg taggacatac tacgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 192
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 192

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 193

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 193

gatcgcgatt tttggagtgg tccatttgac tac

33

<210> 194

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 194

Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 195

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 195

agggccagtc agagtgttag tagaaactta gcc

33

<210> 196

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 196

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 197

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 197

ggtgcatcca ccagggccac t

21

<210> 198

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 198

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1

5

<210> 199

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 199

caccagtata gtaactggat gtgcagt

27

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 200

His Gln Tyr Ser Asn Trp Met Cys Ser

1

5

<210> 201

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 201

agttactact ggagc

15

<210> 202

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 202

Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 203

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 203

cgtatttata tcagtgggag gaccaccttc aaccctccc tcaagagt

48

<210> 204

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 204

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

<210> 205

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 205

gatatatt atggctacct tgactac

27

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 206

Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr
1 5

<210> 207

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp
 <400> 207
 agggccagtc agagtgttag ccgcagttac ttagcc

36

<210> 208
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp
 <400> 208
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 209
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp
 <400> 209
 gatgcatcca gcagggccac t

21

<210> 210
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp
 <400> 210
 Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

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

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp
 <400> 211
 cagcagtatg gtagttcacc gagcacc

27

<210> 212
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 212

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 213

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 213

cattactact ggagc

15

<210> 214

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 214

His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 215

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 215

tatatctatt acagtgggag caccaactac aacctctccc tcaagagt

48

<210> 216

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 216

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Leu Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 217

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 217

ggtatgggct ttgactac

18

<210> 218

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 218

Gly Met Gly Phe Asp Tyr

1

5

<210> 219

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 219

cgggcaagtc aggccattag aaatgattta ggc

33

<210> 220

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 220

Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp Leu Gly

1

5

10

<210> 221

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 221

tctgcatcca gtttgcaaag t

21

<210> 222

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 222
 Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 223
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 223
 ctacagcata atagtttccc tccgacg

27

<210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 224
 Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 225
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 225
 Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr
 1 5 10 15

Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser
 20 25 30

<210> 226
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 226
 Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro
 1 5 10 15

Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
 20 25

<210> 227
 <211> 3222
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 227

atgaagacgt tgctgttga cttggctttg tggtcactgc tcttccagcc cgggtggctg	60
tccttttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg	120
atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggaagatgc ggtgaatgag	180
gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct	240
actttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt	300
gaaggcctcg acctactcag gaaaatttca aatgcacaac ggatgggctg tgtcctcata	360
gggccctcat gtacatactc caccttccag atgtaccttg acacagaatt gagctacccc	420
atgatctcag ctggaagttt tggattgtca tgtgactata aagaaacctt aaccaggctg	480
atgtctccag ctagaaagtt gatgtacttc ttggttaact tttggaaaac caacgatctg	540
cccttcaaaa cttattcctg gagcacttcg tatgtttaca agaatggtag agaaactgag	600
gactgtttct ggtaccttaa tgctctggag gctagcgttt cctatttctc ccacgaactc	660
ggctttaagg tgggtgtaag acaagataag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac	720
aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tcctctacaa gctgaagggg	780
gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atcttttcaa tgaccagtac	840
tttgaggaca atgtcacagc ccctgactat atgaaaaatg tccttgttct gacgctgtct	900
cctgggaatt cccttctaaa tagctcttct tccaggaatc tatcaccaac aaaacgagac	960
tttgctcttg cctatttgaa tggaaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt	1020
gaaaatggag aaaatattac ccccccaaa tttgctcatg ctttcaggaa tctcactttt	1080
gaaggggatg acggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatgggtg	1140
cttctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaaggttc ttttgacctg tgatacccac	1200
gtaaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca cttggaagaa ctctaaactt	1260
cctaatagata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact	1320
ggagctgtgg tgctgtcct gctcgtcgtc ctctgatgc tcagaaaata tagaaaagat	1380
tatgaacttc gtcagaaaaa atgggtccac attcctcctg aaaatatctt tcctctggag	1440
accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc	1500
cagagactac gacagtgcaa atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac	1560
aatgatggta atttactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac	1620
tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat cttcgggggtg	1680
atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttta atgacacaat ttctaccct	1740
gatggcacat tcatggattg ggagtttaag atctctgtct tgtatgacat tgctaagggg	1800
atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc	1860

gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaattc cattttacct 1920
 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa 1980
 ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tcctgcggaa agaaaccttc 2040
 tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gagtggaaaa ttccaatgga 2100
 atgaaaccct tccgccca tttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg 2160
 tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga tttcaaaaaa 2220
 attgagacta cacttgccaa gatatttgga ctttttcatg accaaaaaaa tgaaagctat 2280
 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag 2340
 gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatgttg 2400
 cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat 2460
 gaggaagtta caatctactt cagtgcatt gtaggtttca ctactatctg caaatacagc 2520
 acccccatgg aagtgggtga catgcttaat gacatctata agagttttga ccacattggt 2580
 gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcgggtgat cgtacatggt ggctagtggg 2640
 ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc 2700
 ctcagcttca tggggacctt tgagctggag catcttctctg gcctcccaat atggattcgc 2760
 attggagtgc actctggtcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat 2820
 tgtctatttg gagatacggg caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctccctttg 2880
 agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt 2940
 tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg 3000
 actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaaccctc ctactgtgga gaatcaacag 3060
 cgtttgcaag cagaattttc agacatgatt gccaaactctt tacagaaaag acaggcagca 3120
 gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac 3180
 ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctattttt aa 3222

<210> 228

<211> 1073

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 228

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
 1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
 20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala

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

Asp	Tyr	Met	Lys	Asn	Val	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Asn	Ser		
290						295					300						
Leu	Leu	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Asn	Leu	Ser	Pro	Thr	Lys	Arg	Asp		
305					310					315					320		
Phe	Ala	Leu	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gly	Ile	Leu	Leu	Phe	Gly	His	Met	Leu		
				325					330					335			
Lys	Ile	Phe	Leu	Glu	Asn	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Pro	Lys	Phe	Ala		
			340					345					350				
His	Ala	Phe	Arg	Asn	Leu	Thr	Phe	Glu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Pro	Val	Thr		
		355					360					365					
Leu	Asp	Asp	Trp	Gly	Asp	Val	Asp	Ser	Thr	Met	Val	Leu	Leu	Tyr	Thr		
	370					375					380						
Ser	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	Tyr	Lys	Val	Leu	Leu	Thr	Tyr	Asp	Thr	His		
385					390					395					400		
Val	Asn	Lys	Thr	Tyr	Pro	Val	Asp	Met	Ser	Pro	Thr	Phe	Thr	Trp	Lys		
				405					410					415			
Asn	Ser	Lys	Leu	Pro	Asn	Asp	Ile	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Gln	Ile	Leu		
			420					425					430				
Met	Ile	Ala	Val	Phe	Thr	Leu	Thr	Gly	Ala	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Leu		
		435					440					445					
Val	Ala	Leu	Leu	Met	Leu	Arg	Lys	Tyr	Arg	Lys	Asp	Tyr	Glu	Leu	Arg		
	450					455					460						
Gln	Lys	Lys	Trp	Ser	His	Ile	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Phe	Pro	Leu	Glu		
465					470					475					480		
Thr	Asn	Glu	Thr	Asn	His	Val	Ser	Leu	Lys	Ile	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg		
				485					490					495			
Arg	Asp	Thr	Ile	Gln	Arg	Leu	Arg	Gln	Cys	Lys	Tyr	Asp	Lys	Lys	Arg		
			500					505					510				
Val	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	His	Asn	Asp	Gly	Asn	Phe	Thr	Glu	Lys		
		515					520					525					
Gln	Lys	Ile	Glu	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Gln	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Asn	Leu		
	530					535					540						

Thr	Lys	Phe	Tyr	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Asp	Thr	Met	Ile	Phe	Gly	Val	545	550	555	560
Ile	Glu	Tyr	Cys	Glu	Arg	Gly	Ser	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Asn	Asp	Thr	565	570	575	
Ile	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Phe	Met	Asp	Trp	Glu	Phe	Lys	Ile	Ser	580	585	590	
Val	Leu	Tyr	Asp	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	His	Ser	Ser	Lys	595	600	605	
Thr	Glu	Val	His	Gly	Arg	Leu	Lys	Ser	Thr	Asn	Cys	Val	Val	Asp	Ser	610	615	620	
Arg	Met	Val	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Cys	Asn	Ser	Ile	Leu	Pro	625	630	635	640
Pro	Lys	Lys	Asp	Leu	Trp	Thr	Ala	Pro	Glu	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Asn	645	650	655	
Ile	Ser	Gln	Lys	Gly	Asp	Val	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Ile	Ile	Ala	Gln	Glu	660	665	670	
Ile	Ile	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Phe	Tyr	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Asp	Arg	675	680	685	
Asn	Glu	Lys	Ile	Phe	Arg	Val	Glu	Asn	Ser	Asn	Gly	Met	Lys	Pro	Phe	690	695	700	
Arg	Pro	Asp	Leu	Phe	Leu	Glu	Thr	Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	705	710	715	720
Tyr	Leu	Leu	Val	Lys	Asn	Cys	Trp	Glu	Glu	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Pro	725	730	735	
Asp	Phe	Lys	Lys	Ile	Glu	Thr	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Phe	Gly	Leu	Phe	740	745	750	
His	Asp	Gln	Lys	Asn	Glu	Ser	Tyr	Met	Asp	Thr	Leu	Ile	Arg	Arg	Leu	755	760	765	
Gln	Leu	Tyr	Ser	Arg	Asn	Leu	Glu	His	Leu	Val	Glu	Glu	Arg	Thr	Gln	770	775	780	
Leu	Tyr	Lys	Ala	Glu	Arg	Asp	Arg	Ala	Asp	Arg	Leu	Asn	Phe	Met	Leu	785	790	795	800

Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu
 805 810 815
 Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly
 820 825 830
 Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met
 835 840 845
 Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp
 850 855 860
 Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly
 865 870 875 880
 Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met
 885 890 895
 Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu
 900 905 910
 Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys
 915 920 925
 Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly
 930 935 940
 Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu
 945 950 955 960
 Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu
 965 970 975
 Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
 980 985 990
 Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe
 995 1000 1005
 Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln
 1010 1015 1020
 Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln
 1025 1030 1035
 Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr

1040 1045 1050
 Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
 1055 1060 1065

 Glu Ser Thr Tyr Phe
 1070

 <210> 229
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

 <400> 229
 Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
 1 5 10 15

 Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
 20 25 30

 Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
 35 40 45

 Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
 50 55 60

 Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
 65 70 75 80

 Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
 85 90 95

 Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
 100 105 110

 Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
 115 120 125

 Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
 130 135 140

 Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
 145 150 155 160

 Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
 165 170 175

Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
 180 185 190

Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
 195 200 205

Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
 210 215 220

Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
 225 230 235 240

Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
 245 250 255

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270

Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285

Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300

Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320

Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
 325 330 335

Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350

His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
 355 360 365

Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
 370 375 380

Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
 385 390 395 400

Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
 405 410 415

Asn Ser Lys Leu
 420

<210> 230

<211> 1444

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 230

```

gaattcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac agctacaggt      60
gtccactccc aggtgcagct acagcagtg ggcgcaggac tgttgaagcc ttcggagacc      120
ctgtccctca cctgcgctgt ctttgggtggg tctttcagtg gttactactg gagctggatc      180
cgccagcccc caggggaaggg gctggagtgg attggggaaa tcaatcatcg tggaaacacc      240
aacgacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag      300
ttcgccctga agctgagttc tgtgaccgcc gcggacacgg ctgtttatta ctgtgcgaga      360
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cactggggcc agggaaacct ggtcacccgtc      420
agctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctcctc caagagcacc      480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg      540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag      600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc      660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt      720
gagcccaa at cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg      780
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg      840
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc      900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag      960
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat      1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc      1080
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg      1140
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc      1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct      1260
cccgtgctgg actccgacgg ctcttctctt ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc      1320
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac      1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataat agggataaca gggtaatact      1440
agag                                              1444

```

<210> 231

<211> 468

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 231

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ala Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp
115 120 125

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 232

<211> 722

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 232

```

gcggccgcct caccatggga tggagctgta tcatcctctt cttggtagca acagctacag      60
gtgtccactc cgaaatagtg atgacgcagt ctccagccac cctgtctgtg tctccagggg      120
aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcctgggtatc      180
agcagaaaacc tggccagggt cccagggtcc tcatttatgg tgcattccacc agggccactg      240
gaatcccagc caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga gttcactctc accatcgga      300
gcctgcagtc tgaagatttt gcagtttatt actgtcagca gtataaaacc tggcctcgga      360
cgttcggcca agggaccaac gtggaaatca aacgtacggg ggctgcacca tctgtcttca      420
tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgctgtctga      480
ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg      540
gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca      600
gcaccctgac cctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca      660
cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgttagtcta      720
ga                                         722

```

<210> 233

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 233

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10          15

Val His Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val
          20          25          30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
          35          40          45

Ser Arg Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
          50          55          60

```

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser
 85 90 95
 Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Thr
 100 105 110
 Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 234
 <211> 112
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp
 <400> 234
 ataagaatgc ggccgcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac 60
 agctacaggt gtccactccg aaatagtgat gacgcagtct ccagccaccc tg 112
 <210> 235
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 235
 gccaccgtac gtttgatttc cacgttggtc ccttggccga acgtc 45

<210> 236
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 236
 ccggaattcc tcaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc aacagctaca 60
 ggtgtccact ccaggtgca gctacagcag tggggcgcag gac 103

<210> 237
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 237
 ggaggctgag ctgacgggtga ccagggttcc ctggccccag tggtc 45

<210> 238
 <211> 352
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 238
 caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt cattactact ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg gactggaatg gattgggcgt atctatatca gtgggaggac cagctacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccgtgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcggcta 300
 actgggtact ttgactactg gggccagga accctgggtca ccgtctcctc ag 352

<210> 239
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 239

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser His Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

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

Arg Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 240

<211> 322

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 240

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccgc tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctccctcac ttctggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 241

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 241

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95

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

<210> 242

<211> 353

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 242

caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt cattactact ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg gactggaatg gattgggcgt atctatatca gtgggaggac cagctacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccgtgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggaacac gccgtgtatt actgtgcgag agatcggcta 300
 actgggtact ttgactactg gggccagggg accctgggtca ccgtctcctc agc 353

<210> 243

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 243

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser His Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 244

<211> 329

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 244

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagact ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacccat gtgcagtttt 300

ggccagggga ccaagctgga gatcaaacg 329

<210> 245

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 245

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Met Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 246

<211> 362

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 246

```
gagggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc cgctatgcc aagaactgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc      300
gattttttgga gtggtccatt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca      360
gc                                          362
```

<210> 247

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 247

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20

25

30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 248

<211> 323

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 248

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgta gggccagtca gagggttagt agaagcttag cctgggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctacggt gcatccacca gggccactgg gatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagatgttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggatgtgcag ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa acg 323

<210> 249

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 249

Glu Ile Val Met Thr Pro Ser Ser Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser

20

25

30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Met Cys
 85 90 95

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

<210> 250

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 250

cattactact ggagc

15

<210> 251

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 251

His Tyr Tyr Trp Ser

1

5

<210> 252

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 252

cgatatctata tcagtgggag gaccagctac aaccctccc tcaagagt

48

<210> 253

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 253

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

<210> 254

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 254

gatcggctaa ctgggtactt tgactac

27

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 255

Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 256

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 256

agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc

36

<210> 257

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 257

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 258

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 258

ggtgcatcca gcagggccgc t

21

<210> 259

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 259

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala

1

5

<210> 260

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 260

cagcagtatg gtagctccct cact

24

<210> 261

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 261

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr

1

5

<210> 262

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 262

cattactact ggagc

15

<210> 263

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 263

His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 264

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 264

cgtatctata tcagtgggag gaccagctac aaccctccc tcaagagt

48

<210> 265

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 265

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

<210> 266

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 266

gatcggctaa ctgggtactt tgactac

27

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 267

Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 268

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 268
 agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc

36

<210> 269
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 269
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 270
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 270
 ggtacatcca gcagggccac t

21

<210> 271
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 271
 Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 272
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 272
 cagcagtatg gtagctcacc catgtgcagt

30

<210> 273
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 273

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Cys Ser
 1 5 10

<210> 274

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 274

cgctatgccca tgaac

15

<210> 275

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 275

Arg Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 276

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 276

ggattattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 277

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 277

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 278

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

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 278
 gatcgcgatt tttggagtgg tccatttgac tac

33

<210> 279
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 279
 Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 280
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 280
 agggccagtc agagtgttag tagaagctta gcc

33

<210> 281
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 281
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 282
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 282
 ggtgcatcca ccagggccac t

21

<210> 283
 <211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 283

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1

5

<210> 284

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 284

cagcagtata ataactggat gtgcagt

27

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 285

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Met Cys Ser

1

5

<210> 286

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 286

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc

60

acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt gggtactact ggagctggat ccgccagccc

120

ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caacgacaac

180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccttg

240

aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgcgag agaacgtgga

300

tacacctatg gtaactttga ccactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctccctca

357

<210> 287

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 287

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ala Leu
 65 70 75 80

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

Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 288

<211> 315

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 288

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcaggtact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcacccca 180

gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgt tttctgtcag cagtatgaaa ggtcattcac tttcggccct 300

gggaccaaag tggat 315

<210> 289

<211> 105

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 289

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp
 100 105

<210> 290

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 290

gggtactact ggagc

15

<210> 291

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 291

Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 292

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 292

gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aacccgtccc tcaag

45

<210> 293

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 293

Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1

5

10

15

<210> 294

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 294

gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac

33

<210> 295

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 295

Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His

1

5

10

<210> 296

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 296

agggccagtc agagtgttag cagcaggtac ttagcct

37

<210> 297

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 297

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 298

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 298

ggtgcatcca gcagggccac tg

22

<210> 299

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 299

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 300

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 300

cagcagtatg aaaggtcatt cactt

25

<210> 301

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 301

Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe Thr
1 5

<210> 302

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự liên ứng tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(3)
 <223> Axit amin bất kỳ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Met hoặc Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ser hoặc Asn

<400> 302
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 303
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự liên ứng tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Axit amin bất kỳ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Axit amin bất kỳ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Axit amin bất kỳ hoặc không có mặt

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Axit amin bất kỳ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Thr hoặc Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Tyr, Thr, hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (11)..(12)
 <223> Axit amin bất kỳ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Leu hoặc Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Ser hoặc Gly

<400> 303
 Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa
 1 5 10 15

<210> 304
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự liên ứng tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(6)
 <223> Axit amin bất kỳ và vùng này có thể bao gồm từ 4 đến 6 gốc

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(10)
 <223> Axit amin bất kỳ và vùng này có thể bao gồm từ 2 đến 3 gốc

<400> 304
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
 1 5 10

<210> 305
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự liên ứng tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Arg hoặc Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (6)..(6)
 <223> Val hoặc Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser hoặc Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(16)
 <223> Axit amin bất kỳ và vùng này có thể bao gồm từ 5 đến 9 gốc

<400> 305
 Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

<210> 306
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự liên ứng tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(2)
 <223> Axit amin bất kỳ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Axit amin bất kỳ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Axit amin bất kỳ

<400> 306
 Xaa Xaa Ser Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5

<210> 307
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự liên ứng tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Gln, His, hoặc Met

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Tyr hoặc Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(10)

<223> Axit amin bất kỳ và vùng này có thể bao gồm từ 5 đến 7 gốc

<400> 307

Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 308

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 308

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgaa	60
atagtgatga cgcagtctcc agccaccctg tctgtgtctc caggggaaag agccaccctc	120
tcctgcaggg ccagtcagag tgtagcaga aacttagcct ggtatcagca gaaacctggc	180
caggctccca ggctcctcat ctatggtgca tccaccaggg ccactggaat cccagccagg	240
ttcagtggca gtgggtctgg gacagagttc actctacca tcggcagcct gcagtctgaa	300
gattttgcag tttattactg tcagcagtat aaaacctggc ctcggaaggt cgccaaggg	360
accaacgtgg aaatcaaagc tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct	420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag	540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacctg	600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg	660
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag	702

<210> 309

<211> 1407

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 309

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag	60
gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc	120
tgcgctgtct ttggtgggtc tttcagtggg tactactgga gctggatccg ccagccccca	180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatcgtg gaaacaccaa cgacaacccg	240

tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt cgcctgaag	300
ctgagttctg tgaccgccgc ggacacggct gtttattact gtgcgagaga acgtggatac	360
acctatggta actttgacca ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtcag ctcagcctcc	420
accaagggcc catcggctct cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tcacagcagct tgggcaccca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagttga gcccaaactc	720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1020
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catgcgcgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag	1380
agcctctccc tgtctccggg taaataa	1407

<210> 310

<211> 1410

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 310

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtg ccagtgtgag	60
gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtccct gagactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagccgc tatgccatga actgggtccg ccaggctcca	180
gggaaggggc tggagtgggt ctcaggattt agtgggagtg gtggtaggac atactacgca	240
gactccgtga agggccgggt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac actatatctg	300
caaataaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa agatcgcgat	360

ttttggagtg	gtccatttga	ctactggggc	caggggaacc	tggtcacctg	cagctcagcc	420
tccaccaagg	gcccacggg	cttccccctg	gcacctcct	ccaagagcac	ctctgggggc	480
acagcggccc	tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccggtgac	ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg	ccctgaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	600
ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	gcttggggac	ccagacctac	660
atctgcaacg	tgaatcacia	gcccagcaac	accaagggtg	acaagaaagt	tgagcccaaa	720
tcttgtgaca	aaactcacac	atgcccaccg	tgcccagcac	ctgaactcct	ggggggaccg	780
tcagtcttcc	tcttcccccc	aaaacccaag	gacacctca	tgatctcccg	gacctctgag	840
gtcacatgcg	tgggtggtgga	cgtgagccac	gaagacctg	aggtaagtt	caactggtac	900
gtggacggcg	tggaggtgca	taatgccaa	acaaagccgc	gggaggagca	gtacaacagc	960
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	tggcaaggag	1020
tacaagtgca	aggtctccaa	caaagccctc	ccagccccca	tcgagaaaac	catctccaaa	1080
gccaaagggc	agccccgaga	accacaggtg	tacacctgc	ccccatcccg	ggatgagctg	1140
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctatcccag	cgacatcgcc	1200
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	1260
gactccgacg	gctccttctt	cctctacagc	aagctcaccg	tggacaagag	caggtggcag	1320
caggggaacg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	ctacacgcag	1380
aagagcctct	ccctgtctcc	gggtaaataa				1410

<210> 311

<211> 705

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 311

atgaggctcc	ctgctcagct	tctcttccctc	ctgctactct	ggctcccaga	taccactgga	60
gaaatagtga	tgacgccgtc	ttcagccacc	ctgtctgtgt	ctccagggga	gagagccacc	120
ctctcctgca	gggccagtc	gagtggttagt	agaaacttag	cctgggtacca	gcagaaacct	180
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatggt	gcattccacca	gggccactgg	tatcccagcc	240
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagaa	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagtct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcaccag	tatagtaact	ggatgtgcag	ttttggccag	360
gggaccaagc	tggagatcaa	acgtacgggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccccca	420
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	480
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 312
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Leu hoặc Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Ser hoặc Gly

<400> 312
 Ser Xaa Lys Xaa
 1

<210> 313
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Lys hoặc Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Val hoặc Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser hoặc Leu

<400> 313
 Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa

1

5

<210> 314

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 314

Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr

1

5

10

<210> 315

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 315

Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp

1

5

10

15

<210> 316

<211> 18

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 316

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly

1

5

10

15

Cys Tyr

<210> 317

<211> 638

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 317

Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val

1

5

10

15

Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu

20

25

30

Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn

35

40

45

Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly
 50 55 60

Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu
 65 70 75 80

Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala Gln Arg Met Gly Cys Val Leu
 85 90 95

Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr
 100 105 110

Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys
 115 120 125

Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu
 130 135 140

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

Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
 165 170 175

Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr
 180 185 190

Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu
 195 200 205

Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile
 210 215 220

Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala
 225 230 235 240

Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln
 245 250 255

Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu
 260 265 270

Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser
 275 280 285

Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn
 290 295 300

Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr
 325 330 335
 Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
 340 345 350
 Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr
 355 360 365
 Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val
 370 375 380
 Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp
 385 390 395 400
 Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 405 410 415
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
 420 425 430
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 435 440 445
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 450 455 460
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 465 470 475 480
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 485 490 495
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 500 505 510
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 515 520 525
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 530 535 540
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

545											550											555											560
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly																		
				565					570					575																			
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp																		
				580					585					590																			
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp																		
				595					600					605																			
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His																		
				610					615					620																			
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys																				
				625	630				635																								
<210> 318																																	
<211> 707																																	
<212> PRT																																	
<213> Trình tự nhân tạo																																	
<220>																																	
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp																																	
<400> 318																																	
Ser	Gln	Val	Ser	Gln	Asn	Cys	His	Asn	Gly	Ser	Tyr	Glu	Ile	Ser	Val																		
1				5				10				15																					
Leu	Met	Met	Gly	Asn	Ser	Ala	Phe	Ala	Glu	Pro	Leu	Lys	Asn	Leu	Glu																		
			20				25				30																						
Asp	Ala	Val	Asn	Glu	Gly	Leu	Glu	Ile	Val	Arg	Gly	Arg	Leu	Gln	Asn																		
		35				40				45																							
Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Thr	Val	Asn	Ala	Thr	Phe	Met	Tyr	Ser	Asp	Gly																		
		50				55				60																							
Leu	Ile	His	Asn	Ser	Gly	Asp	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Cys	Glu	Gly	Leu																		
65					70				75			80																					
Asp	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Met	Gly	Cys	Val	Leu																		
				85				90			95																						
Ile	Gly	Pro	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Thr	Phe	Gln	Met	Tyr	Leu	Asp	Thr																		
			100				105						110																				
Glu	Leu	Ser	Tyr	Pro	Met	Ile	Ser	Ala	Gly	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Cys																		
		115				120			125																								

Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu
 130 135 140

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

Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
 165 170 175

Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr
 180 185 190

Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu
 195 200 205

Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile
 210 215 220

Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala
 225 230 235 240

Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln
 245 250 255

Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu
 260 265 270

Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser
 275 280 285

Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn
 290 295 300

Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly
 305 310 315 320

Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr
 325 330 335

Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
 340 345 350

Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr
 355 360 365

Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val
 370 375 380

Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp
 385 390 395 400

Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 405 410 415

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
 420 425 430

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 435 440 445

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 450 455 460

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 465 470 475 480

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 485 490 495

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 500 505 510

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 515 520 525

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 530 535 540

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 545 550 555 560

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 565 570 575

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 580 585 590

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 595 600 605

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 610 615 620

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Leu Asp Leu

21857

[illegible]

```
<210> 319
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 319
Gly Phe Leu Gly
1
```