



(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) 
1-0023072

(51)⁷ **C12N 15/09, A61K 31/337, 31/475,**
39/395, A61P 35/00, 43/00, C07K 16/28,
C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P
21/08

(13) **B**

(21) 1-2013-01567

(22) 27.10.2011

(86) PCT/JP2011/074866 27.10.2011

(87) WO2012/057288A1 03.05.2012

(30) 2010-243549 29.10.2010 JP

(45) 25.02.2020 383

(43) 25.09.2013 306

(73) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)

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

(72) OHTSUKA, Toshiaki (JP), TAKIZAWA, Takeshi (JP), OGUNI, Akiko (JP),
MATSUOKA, Tatsuji (JP), YOSHIDA, Hiroko (JP), MATSUI, Yumi (JP)

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

(54) **KHÁNG THỂ KHÁNG THỤ THỂ GÂY CHẾT 5 (DR5) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể mà có tác dụng điều trị bệnh ung thư, bệnh tự miễn dịch hoặc bệnh viêm. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến kháng thể mà thể hiện hoạt tính gây chết tế bào đối với tế bào biểu hiện thụ thể chứa miên chết thông qua việc gây chết tế bào theo lập trình. Mục đích của sáng chế là đề xuất được phẩm có tác dụng điều trị bệnh ung thư. Kháng thể kháng DR5 mới có khả năng gây chết tế bào theo lập trình ở tế bào có hoạt tính gây chết tế bào tiềm năng hơn so với kháng thể kháng DR5 hiện có sẵn.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với thụ thể bề mặt tế bào có liên quan đến sự gây chết tế bào theo lập trình và hữu ích làm chất điều trị và/hoặc ngăn ngừa khối u và cũng đề cập đến phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, bệnh tự miễn dịch hoặc bệnh viêm bằng cách sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chết tế bào theo chương trình là một hiện tượng thiết yếu của quy trình sinh lý loại bỏ tế bào không cần thiết hoặc tế bào bị tổn hại và duy trì số lượng tế bào thông thường *in vivo*. Do tiến hành giải thích thực tế rằng cơ chế điều hòa sự chết tế bào theo lập trình thường bị suy yếu ở các bệnh ung thư hoặc miễn dịch và cũng giải thích con đường điều hòa sự chết tế bào theo lập trình, sự phát triển chất gây chết tế bào theo lập trình mới mà có thể được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh miễn dịch đã được thúc đẩy. Cụ thể là, kháng thể có ái lực gắn kết đối với phối tử thụ thể bề mặt tế bào liên quan đến sự gây chết tế bào theo lập trình được điển hình bởi thụ thể chết hoặc kháng thể mà có ái lực gắn kết đối với thụ thể chết này được mong đợi có hiệu quả điều trị đối với các bệnh này (xem, ví dụ tài liệu phi sáng chế 1). Thụ thể chết 5 (DR5) là một trong các thụ thể chết đôi khi cũng được gọi là KILLER, TRICK 2A, TRAIL-R2, TRICK B hoặc CD262 và nhiều kháng thể chủ vận gây chết tế bào theo lập trình là đã được biết đến (xem, ví dụ, tài liệu phi sáng chế 2 hoặc 3, hoặc các tài liệu sáng chế từ 1 đến 6). Một số kháng thể hiện đã được phát triển trong các thử nghiệm lâm sàng như các chất điều trị quan tâm và được mong đợi có hiệu quả điều trị như các kháng thể có tác dụng đặc hiệu theo con đường chủ vận đối với tế bào (tế bào ung thư hoặc tế bào liên quan đến bệnh miễn dịch) mà biểu hiện thụ thể để giết chết tế bào. Để kháng thể này có hiệu quả kháng khối u, điều cần thiết rằng các tế bào biểu hiện DR5, tuy nhiên, đã phát hiện ra rằng không có mối tương

quan nào giữa hiệu quả và mức biểu hiện của DR5 trong thử nghiệm cận lâm sàng (tài liệu phi sáng chế 4). Cần phải xem xét rằng do việc đáp ứng tế bào được điều hòa bởi nhiều yếu tố như mức biểu hiện của các phân tử tạo tín hiệu nội bào (như caspase-8 hoặc Bcl-2) liên quan đến các con đường gây chết tế bào (tài liệu phi sáng chế 5).

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế 1: WO 98/51793

Tài liệu sáng chế 2: WO 2001/83560

Tài liệu sáng chế 3: WO 2002/94880

Tài liệu sáng chế 4: WO 2003/54216

Tài liệu sáng chế 5: WO 2006/83971

Tài liệu sáng chế 6: WO 2007/22157

Tài liệu phi sáng chế 1: Cell Death and Differentiation, 10: 66-75 (2003)

Tài liệu phi sáng chế 2: Journal of Immunology, 162: 2597-2605 (1999)

Tài liệu phi sáng chế 3 : Nature Medicine, 7(8): 954-960 (2001)

Tài liệu phi sáng chế 4: Cell Death and Differentiation, 10: 66-75 (2003)

Tài liệu phi sáng chế 5: Journal of Clinical Oncology, 26: 3621-3630 (2008)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể được sử dụng trong dược phẩm có hiệu quả điều trị bệnh ung thư và polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu chuyên sâu để đạt được mục đích trên đây, và kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra kháng thể có hoạt tính gây chết tế bào hiệu lực và do đó hoàn thành sáng chế. Các kháng thể này có tác dụng điều trị hiệu quả ở người bệnh mà người bệnh này không đạt được tác dụng điều trị

đầy đủ của các kháng thể hiện có sẵn.

Nghĩa là, sáng chế bao gồm các phát hiện sau đây.

(1) Kháng thể, khác biệt ở chỗ:

trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi có CDRH1, CDRH2 và CDRH3 và CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 82, CDRH2 bao gồm một trong số các trình tự axit amin được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 83 và 89, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 84; và

trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi có CDRL1, CDRL2 và CDRL3 và CDRL1 bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 79, 85, 86, 87 và 88, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80 và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81 hoặc mảnh chức năng của kháng thể.

(2) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (1), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16.

(3) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (1) hoặc (2), khác biệt ở chỗ, kháng thể này là kháng thể khảm.

(4) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (3), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16.

(5) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (1), khác biệt ở chỗ, kháng thể này được làm giống như của người.

(6) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (5), khác biệt ở chỗ, chứa:

(a) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau đây:

a1) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 42;

a2) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70;

a3) trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được chọn từ a1) và a2);

a4) trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 99% với trình tự axit amin được chọn từ a1) và a2); và

a5) trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài gốc axit amin trong một trong số các trình tự axit amin được chọn từ a1) và a2); và

(b) trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau đây:

b1) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28;

b2) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 52;

b3) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 58;

b4) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62;

b5) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66;

b6) trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 95% với một trong số các trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b5);

b7) trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 99% với một trong số các

trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b5); và

b8) trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài gốc axit amin trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b5).

(7) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 42 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28.

(8) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 52.

(9) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 58.

(10) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62.

(11) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến

đôi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66.

(12) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 42 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28.

(13) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 52.

(14) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 58.

(15) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62.

(16) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66.

(17) Mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (16), được chọn từ nhóm bao gồm Fab, F(ab')₂, Fab' và Fv.

(18) Dược phẩm, khác biệt ở chỗ, bao gồm ít nhất một kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm từ (1) đến (17).

(19) Dược phẩm theo điểm (18), khác biệt ở chỗ, là dược phẩm để điều trị

và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

(20) Dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, khác biệt ở chỗ, bao gồm ít nhất một kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm từ (1) đến (17) và ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm paclitaxel, carboplatin, CPT-11 và vinblastin.

(21) Dược phẩm theo điểm (19) hoặc (20), trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tử cung, khối u ác tính, sarcoma xơ, u nguyên bào đệm và ung thư tế bào máu.

(22) Phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, khác biệt ở chỗ, cho dùng ít nhất một kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (1) đến (17).

(23) Phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, khác biệt ở chỗ, cho dùng liên tục hoặc theo trình tự ít nhất một kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm từ (1) đến (17) và ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm paclitaxel, carboplatin, CPT-11, vinblastin và 5-FU.

(24) Phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa theo (22) hoặc (23), trong đó, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tử cung, khối u ác tính, u nguyên bào đệm và ung thư tế bào máu.

(25) Polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm (2), (4), và từ (6) đến (16).

(26) Polynucleotit theo điểm (25), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID

NO: 19 và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15.

(27) Polynucleotit theo (25), khác biệt ở chỗ, chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 19 và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15.

(28) Polynucleotit theo điểm (25), khác biệt ở chỗ chứa:

(a) polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nucleotit sau đây:

a1) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 41;

a2) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69;

a3) trình tự nucleotit của polynucleotit mà lai với polynucleotit bao gồm phần bổ sung trình tự nucleotit với trình tự nucleotit được chọn từ a1) và a2) trong các điều kiện nghiêm ngặt; và

a4) trình tự nucleotit bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài nucleotit trong trình tự nucleotit được chọn từ a1) và a2); và

(b) polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nucleotit sau đây:

b1) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27;

b2) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 51;

b3) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 57;

b4) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61;

b5) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự

nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 65;

b6) trình tự nucleotit của polynucleotit lai với polynucleotit bao gồm phần bổ sung trình tự nucleotit với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được chọn từ b1) đến a5) trong các điều kiện nghiêm ngặt; và

b7) trình tự nucleotit bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài nucleotit trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự được chọn từ b1) đến b5).

(29) Polynucleotit theo điể (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 41, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27.

(30) Polynucleotit theo điể (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 51.

(31) Polynucleotit theo điể (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 57.

(32) Polynucleotit theo điể (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61.

(33) Polynucleotit theo điể (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit

được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 65.

(34) Polynucleotit theo điểm (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 41, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27.

(35) Polynucleotit theo điểm (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 51.

(36) Polynucleotit theo điểm (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 57.

(37) Polynucleotit theo điểm (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61.

(38) Polynucleotit theo điểm (28), khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO:

65.

(39) Vector bao gồm polynucleotit bất kỳ theo các điểm từ (25) đến (38).

(40) Tế bào chủ được biến nạp bao gồm polynucleotit bất kỳ theo các điểm từ (25) đến (38).

(41) Tế bào chủ được biến nạp bao gồm vector theo điểm (39).

(42) Phương pháp sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm (2), (4), và từ (6) đến (16), bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm (40) hoặc (41) và tinh chế kháng thể từ sản phẩm nuôi cấy thu được.

(43) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể, khác biệt ở chỗ, gắn kết với epitop giống như kháng thể chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16.

(44) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể, khác biệt ở chỗ, cạnh tranh với kháng thể chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16.

(45) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (43) hoặc (44), khác biệt ở chỗ mảnh Fab của kháng thể được tạo ra bằng cách tiêu hóa papain, khi gắn kết protein tái tổ hợp được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23, nằm liền kề với gốc glyxin ở vị trí 26, gốc isoleuxin ở vị trí 34, gốc axit glutamic ở vị trí 36, gốc axit aspartic ở vị trí 37, gốc glyxin ở vị trí 38, gốc axit aspartic ở vị trí 56, gốc leuxin ở vị trí 57, gốc leuxin ở vị trí 58, gốc phenylalanin ở vị trí 59, gốc leuxin ở vị trí 61, và gốc arginin ở vị trí 62 của protein tái tổ hợp được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23 ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn.

(46) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm (45), khác

biệt ở chỗ khoảng cách giữa mỗi gốc axit amin cấu thành protein tái tổ hợp được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23 và mảnh Fab được xác định bởi phân tích cấu trúc phức hợp bằng cách sử dụng dữ liệu nhiễu xạ tia X.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, chất điều trị bệnh ung thư mà cơ chế hoạt động của nó trước hết là thông qua sự gây chết tế bào theo lập trình có thể thu được.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện tác dụng diệt tế bào của kháng thể B273 chuột.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện các hoạt tính gắn kết của kháng thể cB273 và protein miễn ngoại bào từ sTRAIL đến DR5.

Fig.3 là hình vẽ thể hiện hoạt tính gắn kết của kháng thể cB273 với DR5 người bằng cách sử dụng Biacore. Ở phía trên của hình vẽ, đồ thị xác định được thể hiện, trong đó thường thể hiện các đơn vị cộng hưởng (RU), và góc vuông thể hiện thời gian (giây). Ở phía dưới của hình vẽ, các giá trị K_{on} , K_{off} , và KD của kháng thể cB273 được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm phân tích được thể hiện.

Fig.4 là hình vẽ thể hiện tác dụng diệt tế bào *in vitro* của kháng thể cB273 đối với các dòng tế bào ung thư của người. A) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư buồng trứng của người, B) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư ruột kết của người, C) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư phổi của người, và D) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư vú của người.

Fig.5 là hình vẽ thể hiện tác dụng diệt tế bào *in vitro* của kháng thể cB273 đối với các dòng tế bào ung thư của người. A) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư tuyến tụy của người, B) thể hiện kết quả đối với dòng tế bào khối u ác tính của người, C) thể hiện kết quả đối với dòng tế bào u nguyên bào đệm của người, và D) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư màng trong dạ con của người.

Fig.6 là hình vẽ thể hiện cấu trúc phức hợp của DR5-cB273 Fab.

Fig.7 là hình vẽ thể hiện sự tương tác giữa DR5 và chuỗi H hoặc L của

cB273 Fab. A) là hình vẽ minh họa các gốc axit amin của chuỗi H của cB273 Fab mà nằm ở khoảng cách 4Å hoặc nhỏ hơn từ DR5 và ngược lại là mô hình cột buồm. Ile34, Glu36, Asp37, Gly38, Asp56, Leu57, Leu58, Phe59, Leu61, và Arg62 được thể hiện phía bên trái của hình vẽ là các gốc axit amin có nguồn gốc từ DR5, và số lượng gốc axit amin tương ứng tương ứng với số lượng trong trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23 trong danh mục trình tự. Hơn nữa, Phe33, Arg50, Asn52, Tyr54, Asn55, Phe59, Tyr101, Tyr102, Phe103, và Asp104 ở phía bên phải của hình vẽ là các gốc axit amin có nguồn gốc từ chuỗi nặng của cB273, và số lượng gốc axit amin tương ứng đã nêu bằng cách sử dụng gốc axit glutamic ở vị trí 20 của SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự là điểm khởi đầu. B) là hình vẽ minh họa các gốc axit amin của chuỗi L của cB273 Fab mà nằm ở khoảng cách 4Å hoặc nhỏ hơn từ DR5 và ngược lại với một số gốc như mô hình cột buồm và các gốc khác như mô hình ruy-băng. Gly26, Glu36, Asp37, và Gly38 ở phía bên trái của hình vẽ là các gốc axit amin có nguồn gốc từ DR5, và số lượng gốc axit amin tương ứng tương ứng với số lượng trong trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23 trong danh mục trình tự. Hơn nữa, His31, Asn33, Val99, và Trp101 ở phía bên phải của hình vẽ là các gốc axit amin có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ của cB273, và số lượng gốc axit amin tương ứng đã nêu bằng cách sử dụng gốc axit aspartic ở vị trí 21 của SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự là điểm khởi đầu. Các gốc axit amin của DR5 mà nằm ở khoảng cách 4Å hoặc nhỏ hơn từ mảnh Fab của cB273 là gốc glyxin ở vị trí 26, gốc isoleuxin ở vị trí 34, gốc axit glutamic ở vị trí 36, gốc axit aspartic ở vị trí 37, gốc glyxin ở vị trí 38, gốc axit aspartic ở vị trí 56, gốc leuxin ở vị trí 57, gốc leuxin ở vị trí 58, gốc phenylalanin ở vị trí 59, gốc leuxin ở vị trí 61, và gốc arginin ở vị trí 62 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23 trong danh mục trình tự.

Fig.8-1 là hình vẽ thể hiện hoạt tính gắn kết của các kháng thể hB273 với DR5 người bằng cách sử dụng Biacore, và thể hiện biểu đồ xác định đối với các kháng thể tương ứng.

Fig.8-2 là bảng thể hiện hoạt tính gắn kết của các kháng thể hB273 với DR5 người bằng cách sử dụng Biacore, và thể hiện các giá trị Kon, Koff, và KD của các kháng thể tương ứng được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm phân tích. Một cách ngẫu nhiên, số lượng đã nêu đối với mỗi biểu đồ trong Fig.8-1 tương ứng với Số tiếp nhận của bảng trong Fig.8-2.

Fig.9 là hình vẽ thể hiện hoạt tính diệt tế bào *in vitro* của các kháng thể hB273 đối với các tế bào Jurkat mà là dòng tế bào có nguồn gốc từ u bạch huyết T của người.

Fig.10-1 là hình vẽ thể hiện hoạt tính gắn kết của các kháng thể hB273 với DR5 của người bằng cách sử dụng Biacore, và thể hiện biểu đồ xác định đối với các kháng thể tương ứng.

Fig.10-2 là bảng thể hiện hoạt tính gắn kết của các kháng thể hB273 với DR5 người bằng cách sử dụng Biacore, và thể hiện các giá trị Kon, Koff, và KD của các kháng thể tương ứng được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm phân tích. Một cách ngẫu nhiên, số lượng đã nêu đối với mỗi biểu đồ trong Fig.10-1 tương ứng với Số tiếp nhận trong bảng trong Fig.10-2.

Fig.11 là hình vẽ thể hiện hoạt tính diệt tế bào của các kháng thể hB273 đối với tế bào Jurkat mà là dòng tế bào có nguồn gốc từ u bạch huyết T của người.

Fig.12-1 là hình vẽ thể hiện hoạt tính gắn kết của các kháng thể hB273 được biến đổi CDR với DR5 người bằng cách sử dụng Biacore, và thể hiện biểu đồ xác định đối với các kháng thể tương ứng.

Fig.12-2 là bảng thể hiện hoạt tính gắn kết của các kháng thể hB273 được biến đổi CDR với DR5 của người bằng cách sử dụng Biacore, và thể hiện các giá trị Kon, Koff, và KD của các kháng thể tương ứng được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm phân tích. Một cách ngẫu nhiên, số lượng đã nêu với mỗi biểu đồ trong Fig.12-1 tương ứng với Số tiếp nhận trong bảng trong Fig.12-2.

Fig.13-1 là hình vẽ thể hiện cách đánh giá tính ổn định nhiệt của các kháng

thể hB273 được biến đổi CDR bằng cách sử dụng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC), và thể hiện các biểu đồ xác định đối với các kháng thể tương ứng.

Fig.13-2 là hình vẽ thể hiện cách đánh giá tính ổn định nhiệt của các kháng thể hB273 được biến đổi CDR bằng cách sử dụng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC), và thể hiện các biểu đồ xác định đối với các kháng thể tương ứng.

Fig.13-3 thể hiện các giá trị T_m của các kháng thể tương ứng được tính toán từ các biểu đồ được thể hiện trong các Fig.13-1 và 13-2. Một cách ngẫu nhiên, số lượng đã nêu với mỗi biểu đồ trong Fig.13-1 và 13-2 tương ứng với số tiếp nhận trong Fig.13-3.

Fig.14 là hình vẽ thể hiện hoạt tính diệt tế bào *in vitro* của các kháng thể hB273 được biến đổi CDR đối với tế bào Jurkat mà là dòng tế bào có nguồn gốc từ u bạch huyết T của người.

Fig.15 là hình vẽ thể hiện tác dụng hoạt hóa caspase-3/7 và hoạt tính diệt tế bào *in vitro* của kháng thể hB273_H2-1-NE/L1-NK đối với các dòng tế bào ung thư của người. A) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15, và B) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào u nguyên bào đệm của người U-87MG.

Fig.16 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư ruột kết của người COLO 205.

Fig.17 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư tuyến tụy của người MIAPaCa-2.

Fig.18 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào u nguyên bào đệm của người U-87MG.

Fig.19 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể

cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H2122 (kết hợp với paclitaxel và carboplatin).

Fig.20 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H460 (kết hợp với paclitaxel và carboplatin).

Fig.21 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư ruột kết của người DLD-1 (kết hợp với CPT-11).

Fig.22 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 (kết hợp với CPT-11).

Fig.23 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-116 (kết hợp với CPT-11).

Fig.24 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể cB273 ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào khối u ác tính của người A375 (kết hợp với vinblastine).

Fig.25 là hình vẽ thể hiện sự so sánh hoạt tính kháng khối u *in vivo* ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 giữa kháng thể cB273 và conatumumab.

Fig.26 là hình vẽ thể hiện sự so sánh hoạt tính kháng khối u *in vivo* ở chuột trụi lông được cấy vào dòng tế bào ung thư phổi NCI-H1975 giữa kháng thể cB273 và conatumumab.

Fig.27 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể hB273_H2-1-NE/L1-NK (được biểu hiện là “hB273” trong hình vẽ) ở chuột trụi lông được cấy vào tế bào ung thư ruột kết của người COLO 205.

Fig.28 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi

nặng B273 kháng thể chuột và trình tự axit amin của chuỗi nặng B273 kháng thể chuột.

Fig.29 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ B273 kháng thể chuột và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ B273 kháng thể chuột.

Fig.30 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu khảm B273 và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu khảm B273.

Fig.31 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu khảm B273 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu khảm B273.

Fig.32 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_L1.

Fig.33 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L2 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_L2.

Fig.34 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L3 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_L3.

Fig.35 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_H1 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H1.

Fig.36 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2.

Fig.37 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H3 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H3.

Fig.38 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1.

Fig.39 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1.

Fig.40 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-2 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-2.

Fig.41 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu

hB273_H2-3 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-3.

Fig.42 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-4 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-4.

Fig.43 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-5 và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-5.

Fig.44 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NE và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NE.

Fig.45 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NF và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NF.

Fig.46 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NK và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NK.

Fig.47 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NL và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NL.

Fig.48 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1-NE và trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1-NE.

Fig.49 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ conatumumab và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ conatumumab.

Fig.50 là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng conatumumab và trình tự axit amin của chuỗi nặng conatumumab.

Fig.51 là hình vẽ thể hiện hoạt tính diệt tế bào *in vitro* của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK đối với các dòng tế bào ung thư của người. A) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư dạ dày của người, B) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư thận của người, C) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào ung thư gan của người, và D) thể hiện các kết quả đối với dòng tế bào sarcoma xơ của người.

Fig.52 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK (được thể hiện là “hB273” trong hình vẽ) kết hợp

với 5-FU ở chuột trụi lông được cấy với dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 và so sánh hoạt tính với conatumumab.

Fig.53 là hình vẽ thể hiện hoạt tính kháng khối u *in vivo* của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK (được thể hiện là “hB273” trong hình vẽ) kết hợp với paclitaxel ở chuột trụi lông được cấy với dòng tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ của người NCI-H1975 và so sánh hoạt tính với conatumumab.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “ung thư” và “khối u” như được sử dụng ở đây được sử dụng với nghĩa tương tự.

Thuật ngữ “gen” như được sử dụng ở đây không chỉ bao gồm ADN, mà còn bao gồm ARN thông tin của nó, ADN bổ trợ và ARN bổ trợ của nó.

Thuật ngữ “polynucleotit” như được sử dụng ở đây được sử dụng với nghĩa tương tự như “axit nucleic” và cũng bao gồm ADN, ARN, đầu dò, oligonucleotit, và đoạn môi.

Thuật ngữ “polypeptit” và “protein” như được sử dụng ở đây được sử dụng mà không có sự khác biệt.

Thuật ngữ “mảnh ARN” như được sử dụng ở đây đề cập đến mảnh chứa ARN.

Thuật ngữ “tế bào” như được sử dụng ở đây cũng bao gồm các tế bào ở cá thể động vật và tế bào được nuôi cấy.

Thuật ngữ “biến nạp tế bào ác tính” như được sử dụng ở đây đề cập đến trạng thái trong đó tế bào thể hiện sự tăng sinh bất thường, ví dụ, tế bào mất độ nhạy tiếp xúc kiểu hiện ức chế, tế bào thể hiện sự tăng sinh phụ thuộc neo và v.v, và tế bào thể hiện sự tăng sinh tế bào bất thường được gọi là “tế bào ung thư”.

Thuật ngữ “tổn thương tế bào” như được sử dụng ở đây đề cập đến trạng thái trong đó gây ra sự thay đổi bệnh lý ở tế bào ở dạng một số loại và tổn thương tế bào không bị giới hạn đến tổn thương trực tiếp và bao gồm tất cả loại tổn hại đến cấu

trúc và chức năng của tế bào như phân tách ADN, tạo thành bazơ-dime, phân tách nhiễm sắc thể, tổn hại cơ chế phân chia tế bào và giảm các hoạt tính enzym khác nhau.

Thuật ngữ “hoạt tính độc tế bào” như được sử dụng ở đây đề cập đến hoạt tính gây tổn thương tế bào được mô tả trên đây.

Thuật ngữ “thụ thể chứa miền chết” (mà bao gồm Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5, và DR6, mặc dù không bị giới hạn) như được sử dụng ở đây đề cập đến phân tử thụ thể có vùng truyền tín hiệu gây chết tế bào theo lập trình được gọi là “miền chết” thể hiện tính tương đồng với gen tự tử ruồi giấm, gen gặt, trong miền nội bào.

Thuật ngữ “mảnh chức năng của kháng thể” như được sử dụng ở đây đề cập đến mảnh riêng phần của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên và bao gồm Fab, F(ab')₂, scFv, và tương tự. Thuật ngữ này cũng bao gồm Fab' là mảnh có hóa trị một trong vùng biến đổi của kháng thể thu được bằng cách xử lý F(ab')₂ trong các điều kiện giảm. Tuy nhiên, thuật ngữ này không bị giới hạn đến các phân tử này miễn là mảnh này có ái lực gắn kết đối với kháng nguyên. Hơn nữa, các mảnh chức năng này không chỉ bao gồm mảnh thu được bằng cách xử lý đầy đủ phân tử protein kháng thể với enzym thích hợp, nhưng cũng bao gồm protein được tạo ra ở tế bào chủ thích hợp bằng cách sử dụng gen kháng thể được biến đổi về mặt di truyền.

Thuật ngữ “Fab'” như được sử dụng ở đây đề cập đến mảnh có hóa trị một trong vùng biến đổi của kháng thể thu được bằng cách xử lý F(ab')₂ trong các điều kiện giảm như được mô tả trên đây. Tuy nhiên, Fab' được tạo ra bằng cách sử dụng gen kháng thể được biến đổi về mặt di truyền cũng được bao gồm trong Fab' theo sáng chế.

Thuật ngữ “kháng thể mảnh biến đổi chuỗi đơn”, như được sử dụng ở đây được sử dụng với nghĩa tương tự như Fv (scFv) chuỗi đơn.

Thuật ngữ “epitop” như được sử dụng ở đây đề cập đến peptit riêng phần hoặc cấu trúc bậc ba riêng phần của kháng nguyên mà kháng thể đặc hiệu gắn kết.

Epitop là peptit riêng phần của kháng nguyên có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này như thử nghiệm miễn dịch và ví dụ phương pháp sau đây có thể được dùng. Thứ nhất, các cấu trúc riêng phần khác nhau của kháng nguyên được tạo ra. Trong sản xuất cấu trúc riêng phần, kỹ thuật tổng hợp oligopeptit đã biết có thể được sử dụng. Ví dụ, nhiều polypeptit có chiều dài giảm thích hợp thu được bằng cách rút ngắn về mặt trình tự kháng nguyên từ tận cùng C hoặc tận cùng N được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Sau đó, khả năng phản ứng của kháng thể với các polypeptit này được thử nghiệm và vị trí nhận biết được xác định đại thể. Sau đó, các peptit có chiều dài ngắn hơn được tổng hợp và khả năng phản ứng với các peptit này được thử nghiệm, nhờ đó epitop có thể được xác định. Hơn nữa, epitop mà có cấu trúc bậc ba riêng phần của kháng nguyên gắn kết với kháng thể đặc hiệu có thể được xác định bằng cách định rõ các gốc axit amin của kháng nguyên mà nằm liền kề với kháng thể bởi phân tích cấu trúc tia X.

Thuật ngữ “kháng thể gắn kết với cùng epitop” như được sử dụng ở đây đề cập đến các kháng thể khác nhau mà gắn kết với epitop thông thường. Nếu kháng thể thứ hai gắn kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc bậc ba riêng phần mà kháng thể thứ nhất gắn kết, có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai gắn kết với cùng epitop. Hơn nữa, bằng cách thừa nhận rằng kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với kháng nguyên (nghĩa là, kháng thể thứ hai ức chế gắn kết giữa kháng thể thứ nhất và kháng nguyên), có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai gắn kết với cùng epitop nếu trình tự epitop đặc hiệu hoặc cấu trúc không được xác định. Hơn nữa, khi kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai gắn kết với cùng epitop và hơn nữa kháng thể thứ nhất có tác dụng đặc hiệu như hoạt tính gây chết tế bào theo lập trình, có thể được mong đợi rằng kháng thể thứ hai cũng có hoạt tính tương tự.

Thuật ngữ “CDR” như được sử dụng ở đây đề cập đến vùng quyết định phần bổ sung (CDR), và đã biết được rằng mỗi chuỗi nặng và nhẹ của phân tử kháng thể có ba vùng quyết định phần bổ sung (CDR). CDR cũng được gọi là miền siêu biến và có mặt trong vùng biểu đổi của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Đây là một vị trí mà có khả năng biến đổi cao khác thường trong cấu trúc nguyên thủy của nó và có ba CDR riêng rẽ trong cấu trúc nguyên thủy của mỗi chuỗi polypeptit nặng và nhẹ. Theo sáng chế, đối với các CDR của kháng thể, các CDR của chuỗi nặng được thể hiện bởi CDRH1, CDRH2, và CDRH3 từ phía tận cùng amino của trình tự axit amin của chuỗi nặng và các CDR của chuỗi nhẹ được thể hiện bởi CDRL1, CDRL2, và CDRL3 từ phía tận cùng amino của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ. Các vị trí này sát gần với nhau trong cấu trúc bậc ba và xác định tính đặc hiệu đối với kháng nguyên mà kháng thể gắn kết.

Thuật ngữ “kháng thể thứ yếu” như được sử dụng ở đây đề cập đến kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với phân tử kháng nguyên, nhờ đó liên kết ngang các phân tử kháng thể.

Cụm từ “lai được thực hiện trong các điều kiện nghiêm ngặt” như được sử dụng ở đây đề cập đến quy trình trong đó lai được thực hiện trong các điều kiện trong đó việc xác định đạt được bằng cách tiến hành lai ở 68°C trong dung dịch lai hiện bán sẵn trên thị trường ExpressHyb Hybridization Solution (được sản xuất bởi Clontech, Inc.) hoặc tiến hành lai ở 68°C với sự có mặt của từ 0,7 đến 1,0M NaCl bằng cách sử dụng chất lọc có ADN bất động trong đó, tiếp theo tiến hành rửa ở 68°C bằng cách sử dụng từ 0,1 đến 2 x SSC dung dịch (1 x SSC dung dịch bao gồm 150mM NaCl và 15mM natri xitrat) trong các điều kiện tương đương của nó.

Thuật ngữ “vài axit amin” theo sáng chế “trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài axit amin” như được sử dụng ở đây đề cập đến số lượng tùy ý các gốc axit amin được chọn từ 2 đến 10. Cụ thể hơn nữa là, khi 10 hoặc một vài axit amin, từ 5 đến 6 hoặc một vài axit amin hoặc từ 2 đến 3 hoặc một vài

axit amin được thay thế, bớt hoặc thêm, phần mô tả “trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm một vài axit amin” được sử dụng.

Phần mô tả, ví dụ, “vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 34” như được sử dụng ở đây được sử dụng với nghĩa tương tự như mô tả “trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 34”. Hơn nữa, mô tả, ví dụ, “chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 34” được sử dụng với nghĩa tương tự như mô tả “trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 34”.

1. Về việc gen có liên quan đến chết tế bào theo lập trình

Kháng thể theo sáng chế cần phải gắn kết với kháng nguyên đặc hiệu và thể hiện hoạt tính độc tế bào qua kháng nguyên. Hơn nữa, cần phải chọn kháng nguyên có mặt đặc hiệu trong tế bào khối u để ngăn ngừa tế bào thông thường khỏi bị giết chết. Một ví dụ về nhóm kháng nguyên này có thể bao gồm yếu tố gây chết hoại khối u (sau đây, được gọi là “TNF” theo sáng chế) liên quan đến các nhóm thụ thể phổi tử gây chết tế bào theo lập trình (sau đây, được gọi là “TRAIL” theo sáng chế). TRAIL là thành phần của protein họ TNF và bao gồm các phối tử Fas và TNF- α (Wiley SR, et al., Immunity 1995 Dec; 3 (6): 673-82). Các protein này là các yếu tố gây chết tế bào mạnh.

Các thụ thể đối với các protein họ TNF khác biệt ở chỗ các trình tự lặp lại giàu xystein trong miền ngoại bào. Trong số chúng, Fas là thụ thể đối với các phối tử Fas và thụ thể TNF I (sau đây, được gọi là “TNFRI” theo sáng chế) mà là thụ thể đối với TNF α có, trong miền nội bào, vùng thiết yếu để truyền tín hiệu gây chết tế bào theo lập trình được gọi là “miền chết” là một vùng thể hiện tính tương đồng với gen tự tử của ruồi giấm, gen gặt, (Golstein, P., et al., (1995) Cell. 81, 185-186; và White, K, et al., (1994) Science 264, 677-683), và được gọi chung là các thụ thể chứa miền chết.

Năm thụ thể đối với TRAIL đã được nhận biết và trong số chúng, hai thụ thể (DR4 (TRAIL-R1) và DR5 (TRAIL-R2)) có khả năng truyền tín hiệu gây chết tế bào theo lập trình và ba thụ thể khác (DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4), và osteoprotegerin (OPG)) không truyền tín hiệu gây chết tế bào theo lập trình. Tương tự như Fas và TNFRI, DR4 và DR5 bao gồm miền chết trong mảnh nội bào và truyền tín hiệu gây chết tế bào theo lập trình qua con đường chứa protein miền chết kết hợp Fas (sau đây, được gọi là “FADD” theo sáng chế) và caspase 8 (Chaudhary PM, et al., *Immunity* 1997 Dec; 7 (6): 813-20; và Schneider P, et al. *Immunity* 1997 Dec; 7 (6): 821-30). Đối với Fas, TNFRI, DR4 hoặc DR5 được mô tả trên đây, đã biết được rằng kháng thể gắn kết với phân tử bất kỳ trong số các phân tử này và có chức năng làm chất chủ vận thể hiện hoạt tính gây chết tế bào theo lập trình đối với tế bào mang phân tử trên bề mặt tế bào (*Journal of Cellular Physiology*, 209: 1221-1028 (2006); *Leukemia, Apl*; 21 (4): 805-812 (2007); *Blood*, 99: 1666-1675 (2002); và *Cellular Immunology*, Jan; 153 (1): 184-193 (1994)). Tác dụng dược lý của kháng thể chủ vận được mô tả trên đây được tăng cường bằng cách liên kết ngang với kháng thể thứ yếu hoặc tế bào phản ứng kích thích (*Journal of Immunology*, 149: 3166-3173 (1992); và *European Journal of Immunology*, Oct; 23 (10): 2676-2681 (1993)).

Trình tự nucleotit của gen DR5 người (thụ thể chết 5) và trình tự axit amin của nó đã được đăng ký là GI:22547118 (Số lưu trữ NM_147187) trong GenBank. Một cách ngẫu nhiên, trình tự nucleotit mã hóa protein, mà có trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài axit amin trong trình tự axit amin của DR5 và cũng có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của DR5 cũng được bao gồm trong nghĩa của thuật ngữ “trình tự nucleotit của gen DR5”. Hơn nữa, protein có trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài axit amin trong trình tự axit amin của DR5 và cũng có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của DR5 cũng được bao gồm trong nghĩa của thuật ngữ “DR5”.

2. Sản xuất kháng thể kháng DR5

Kháng thể kháng DR5 theo sáng chế có thể thu được bằng cách tạo miễn dịch động vật với DR5 hoặc polypeptit tùy ý được chọn từ trình tự axit amin của DR5 và gom và tinh chế kháng thể được tạo ra *in vivo* theo quy trình chung. Các loài sinh vật chứa DR5 được sử dụng làm kháng nguyên là không bị giới hạn đến con người và động vật có thể được tạo miễn dịch với DR5 có nguồn gốc từ động vật khác với con người như chuột cống hoặc chuột nhắt. Trong trường hợp này, bằng cách thử nghiệm khả năng phản ứng ngang giữa kháng thể gắn kết với DR5 khác loại thu được và DR5 của người, kháng thể có khả năng áp dụng cho bệnh của người có thể được chọn.

Hơn nữa, kháng thể đơn dòng có thể thu được bằng cách dung hợp tế bào tạo ra kháng thể mà tạo ra kháng thể kháng DR5 với tế bào u tủy để tạo ra tế bào lai theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler và Milstein, *Nature*, (1975) 256, pp. 495-497, Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

Một cách ngẫu nhiên, DR5 được sử dụng như kháng nguyên có thể thu được bằng kỹ thuật di truyền để gây cho tế bào chủ thể hiện gen DR5.

Cụ thể là, vectơ có khả năng biểu hiện gen DR5 được tạo ra và vectơ thu được được biến nạp vào tế bào chủ để biểu hiện gen và sau đó tinh chế DR5 được biểu hiện. Sau đây, phương pháp thu được kháng thể kháng DR5 sẽ được mô tả một cách cụ thể.

(1) Sản xuất kháng nguyên

Các ví dụ về kháng nguyên được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng DR5 bao gồm DR5, polypeptit bao gồm trình tự axit amin riêng phần chứa ít nhất 6 axit amin liên tiếp của DR5, và dẫn xuất thu được bằng cách thêm trình tự axit amin thu được hoặc chất mang vào.

DR5 có thể được tinh chế trực tiếp từ mô khối u hoặc tế bào khối u của người và sử dụng. Hơn nữa, DR5 có thể thu được bằng cách tổng hợp *in vitro* hoặc

bằng cách gây cho tế bào chủ tạo ra nhờ kỹ thuật di truyền.

Liên quan đến kỹ thuật di truyền, cụ thể là, ADN bổ trợ DR5 được tích hợp vào vector có khả năng biểu hiện ADN bổ trợ DR5 và DR5 được tổng hợp trong dung dịch chứa enzym, chất nền và chất năng lượng cần để sao chép và dịch mã hoặc tế bào chủ chưa có nhân thật hoặc có nhân thật khác được biến nạp để biểu hiện DR5, nhờ đó kháng nguyên có thể thu được.

Hơn nữa, kháng nguyên cũng có thể thu được như protein kích thích bài tiết bằng cách biểu hiện protein dung hợp thu được bằng cách kết hợp miễn ngoại bào của DR5, mà là protein màng, với vùng cố định của kháng thể trong hệ vector chủ thích hợp.

ADN bổ trợ DR5 có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp được gọi là PCR trong đó phản ứng chuỗi polymeraza (sau đây được gọi là “PCR”) được thực hiện bằng cách sử dụng thư viện ADN bổ trợ chứa ADN bổ trợ DR5 làm khuôn mà đoạn mồi mà khuếch đại đặc hiệu ADN bổ trợ DR5 (xem Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489).

Đối với hệ tổng hợp in vitro của polypeptit, Rapid Translation System (RTS) được sản xuất bởi Roche Diagnostics, Inc. có thể được lấy làm ví dụ nhưng không bị giới hạn đến hệ này.

Các ví dụ về tế bào chủ chưa có nhân thật bao gồm *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*. Để biến nạp tế bào chủ với gen đích, tế bào chủ được biến nạp bằng cách sử dụng vector plasmit chứa bản sao, nghĩa là, nguồn gốc của sao chép được bắt nguồn từ các loài tương thích với vật chủ và trình tự điều hòa. Hơn nữa, tốt hơn là, vector có trình tự có khả năng áp đặt tính chọn lọc kiểu hình đối với tế bào được biến nạp.

Các ví dụ về tế bào chủ có nhân thật bao gồm tế bào của động vật có xương sống, tế bào côn trùng và tế bào nấm men. Đối với tế bào của động vật có xương sống, ví dụ, cá chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. và Chasin, L. A.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) có tế bào simian COS (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), nguyên bào sợi của chuột NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO; ATCC: CCL-61); và tương tự thường được sử dụng, tuy nhiên, chúng không bị giới hạn đến các tế bào này.

Tế bào biến nạp thu được theo cách này có thể được nuôi cấy theo quy trình thông thường, và bằng cách nuôi cấy tế bào biến nạp, polypeptit đích được tạo ra nội bào hoặc ngoại bào.

Môi trường thích hợp được sử dụng để nuôi cấy có thể được chọn từ các môi trường nuôi cấy được sử dụng thông thường khác nhau phụ thuộc vào tế bào chủ được dùng. Nếu *Escherichia coli* được dùng, ví dụ, môi trường LB được bổ sung với thuốc kháng sinh như ampicilin hoặc IPMG, nếu cần, có thể được sử dụng.

Protein tái tổ hợp được tạo ra nội bào hoặc ngoại bào nhờ tế bào biến nạp thông qua nuôi cấy này có thể được tách và tinh chế bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp tách đã biết khác nhau bằng cách sử dụng đặc tính vật lý hoặc hóa học của protein.

Các ví dụ cụ thể về các phương pháp này bao gồm xử lý kết tủa protein thông thường, siêu lọc, các loại sắc ký lỏng khác nhau như sắc ký sàng phân tử (lọc gel), sắc ký hút bám, sắc ký trao đổi ion và sắc ký ái lực, thẩm tách và kết hợp của chúng.

Hơn nữa, bằng cách gắn tag của sáu gốc histidin vào protein tái tổ hợp được biểu hiện, protein có thể được tinh chế một cách hiệu quả với cột ái lực niken. Theo cách khác, bằng cách gắn vùng IgG Fc với protein tái tổ hợp được biểu hiện, protein có thể được tinh chế một cách hiệu quả với cột protein A.

Bằng cách kết hợp các phương pháp được mô tả trên đây, một lượng lớn polypeptit đích có thể được tạo ra một cách dễ dàng với hiệu suất cao và độ tinh khiết cao.

(2) Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng DR5

Các ví dụ về kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với DR5 bao gồm kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu với DR5, và phương pháp thu được kháng thể là như được mô tả dưới đây.

Sản xuất kháng thể đơn dòng thường cần các bước thao tác sau đây:

- (a) tinh chế polyme sinh học sẽ được sử dụng làm kháng nguyên;
- (b) chuẩn bị tế bào tạo ra kháng thể bằng cách tạo miễn dịch động vật bằng cách tiêm kháng nguyên, gom máu, đánh giá độ chuẩn kháng thể của nó để xác định khi lá lách được cắt bỏ;
- (c) chuẩn bị tế bào u tủy (sau đây được gọi là "u tủy");
- (d) dung hợp tế bào tạo ra kháng thể với u tủy;
- (e) sàng lọc nhóm tế bào lai tạo ra kháng thể đích;
- (f) phân chia tế bào lai thành thể đơn dòng tế bào đơn (tạo đơn dòng);
- (g) tùy ý, nuôi cấy tế bào lai hoặc nuôi động vật được cấy tế bào lai này để tạo ra một lượng lớn kháng thể đơn dòng;
- (h) thử nghiệm kháng thể đơn dòng được tạo ra theo cách này đối với hoạt tính sinh học và tính đặc hiệu gắn kết hoặc đánh giá tương tự đối với các đặc tính như chất phản ứng đánh dấu; và tương tự.

Sau đây, phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng sẽ được mô tả chi tiết theo các bước trên đây, tuy nhiên, phương pháp này không bị giới hạn, và ví dụ, tế bào tạo ra kháng thể khác với tế bào lá lách và u tủy có thể được sử dụng.

(a) Tinh chế kháng nguyên

Đối với kháng nguyên, DR5 được tạo ra bằng phương pháp như được mô tả trên đây hoặc peptit riêng phần của nó có thể được sử dụng.

Hơn nữa, phân đoạn màng được tạo ra từ tế bào tái tổ hợp biểu hiện DR5 hoặc tế bào tái tổ hợp tự biểu hiện DR5 và cả peptit riêng phần của protein theo sáng chế được tổng hợp về mặt hóa học bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu

biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên.

(b) Chuẩn bị tế bào tạo ra kháng thể

Kháng nguyên thu được trong bước (a) được trộn với tá được như tá được đầy đủ hoặc không đầy đủ Freund hoặc nhôm kali sulfat và hỗn hợp thu được được sử dụng làm chất kháng nguyên để tạo miễn dịch động vật thử nghiệm. Đối với động vật thử nghiệm, động vật bất kỳ được sử dụng trong phương pháp sản xuất tế bào lai đã biết có thể được sử dụng mà không gặp khó khăn bất kỳ. Cụ thể là, ví dụ, chuột cống, chuột nhắt, dê, cừu, gia súc, ngựa hoặc tương tự có thể được sử dụng. Tuy nhiên, từ quan điểm về sự không ràng buộc về tính sẵn có của tế bào u tủy được dung hợp với tế bào tạo ra kháng thể được chiết, chuột cống hoặc chuột nhắt tốt hơn là được sử dụng làm động vật sẽ được tạo miễn dịch.

Hơn nữa, chủng chuột nhắt hoặc chuột cống được sử dụng không bị giới hạn một cách đặc biệt, và trong trường hợp chuột nhắt, ví dụ, các chủng khác nhau như A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, và 129 có thể được sử dụng và trong trường hợp về chuột cống, ví dụ, Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer, và tương tự có thể được sử dụng.

Trong số chúng, xem xét tính tương hợp dung hợp với tế bào u tủy như được mô tả dưới đây, trong trường hợp chuột nhắt, chủng BALB/c, và trong trường hợp về chuột cống, các chủng Wistar và Low tốt hơn là được ưu tiên làm chuột sẽ được tạo miễn dịch.

Hơn nữa, xem xét tính tương đồng kháng nguyên giữa người và chuột nhắt, cũng được ưu tiên sử dụng chuột nhắt có chức năng sinh học giảm để loại bỏ các tự kháng thể, nghĩa là, chuột nhắt mắc bệnh tự miễn dịch.

Tuổi của chuột nhắt hoặc chuột cống ở thời gian tạo miễn dịch tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 12 tuần tuổi, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 6 đến 8 tuần tuổi.

Để tạo miễn dịch động vật với DR5 hoặc protein tái tổ hợp của nó, ví dụ, phương pháp đã biết được mô tả chi tiết, ví dụ trong Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964), hoặc tương tự có thể được sử dụng.

Các tế bào lá lách hoặc tế bào bạch huyết bao gồm các tế bào tạo ra kháng thể được tách một cách vô trùng ra khỏi động vật được tạo miễn dịch. Ở thời gian này, độ chuẩn kháng thể được xác định và nếu động vật có độ chuẩn kháng thể đủ được sử dụng làm nguồn cấp tế bào tạo ra kháng thể, quy trình sau đó có thể được thực hiện một cách hiệu quả hơn.

Các ví dụ về phương pháp xác định độ chuẩn kháng thể được sử dụng ở đây bao gồm phương pháp RIA và phương pháp ELISA, nhưng phương pháp này là không bị giới hạn.

Việc tách tế bào tạo ra kháng thể từ tế bào lá lách hoặc tế bào bạch huyết của động vật được tạo miễn dịch có thể được thực hiện theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature (1977), 266, p. 495).

(c) Tế bào u tủy (sau đây được gọi là "u tủy")

Tế bào u tủy được sử dụng để dung hợp tế bào là không bị giới hạn một cách đặc biệt và các tế bào thích hợp có thể được chọn từ các dòng tế bào đã biết. Tuy nhiên, xem xét đến sự tiện lợi khi tế bào lai được chọn từ tế bào được dung hợp, được ưu tiên để sử dụng chủng thiếu hụt HGPRT (hypoxanthin-guanin phosphoribosyl transferaza) mà quy trình chọn lọc của nó đã được thiết lập.

Cụ thể hơn nữa là, các ví dụ về chủng thiếu hụt HGPRT bao gồm X63-Ag8 (X63), NS1-ANS/1 (NS1), P3X63-Ag8.U1 (P3U1), X63-Ag8.653 (X63.653), SP2/0-Ag14 (SP2/0), MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG), F0, S149/5XXO, và BU.1 có nguồn gốc từ chuột nhắt; 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3) có nguồn gốc từ chuột cống; và

U266AR (SKO-007), GM1500-GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2) và 8226AR/NIP4-1 (NP41) có nguồn gốc từ con người.

(d) Dung hợp tế bào

Sự dung hợp giữa các tế bào tạo ra kháng thể và tế bào u tủy có thể được thực hiện một cách thích hợp theo phương pháp đã biết (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.), trong các điều kiện sao cho tỷ lệ sống sót của tế bào không bị giảm quá mức.

Đối với phương pháp này, ví dụ, phương pháp hóa học trong đó tế bào tạo ra kháng thể và tế bào u tủy được trộn trong dung dịch chứa polyme như polyetylen glycol ở nồng độ cao, phương pháp vật lý bằng cách sử dụng sự kích thích bằng điện hoặc tương tự có thể được sử dụng.

(e) Chọn lọc nhóm tế bào lai

Phương pháp chọn lọc tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào được mô tả trên đây là không bị giới hạn một cách đặc biệt. Thông thường, phương pháp chọn lọc HAT (hypoxanthin, aminopterin, thymidin) (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550) là được sử dụng.

Phương pháp này có hiệu quả khi tế bào lai thu được bằng cách sử dụng tế bào u tủy của chủng thiếu hụt HGPRT mà không có thể sống sót với sự có mặt của aminopterin.

Tức là, bằng cách nuôi cấy tế bào không được dung hợp và tế bào lai trong môi trường HAT, chỉ có tế bào lai kháng aminopterin được cho phép chọn lọc sống sót và tăng sinh.

(f) Phân chia thành thể đơn dòng tế bào đơn (tạo đơn dòng)

Đối với phương pháp tạo đơn dòng tế bào lai, phương pháp đã biết như phương pháp metylenluloza, phương pháp agarosa mềm hoặc phương pháp pha

loãng giới hạn có thể được sử dụng (xem, ví dụ, Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: *Selected Methods in Cellular Immunology*, W. H. Freeman và Company, San Francisco (1980)). Trong số các phương pháp này, cụ thể là, phương pháp nuôi cấy ba chiều như phương pháp methylxenluloza là được ưu tiên. Ví dụ, nhóm tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào được tạo huyền phù trong môi trường methylxenluloza như ClonaCell-HY Selection Medium D (được sản xuất bởi StemCell Technologies, inc., #03804) và nuôi cấy. Sau đó, các khuẩn lạc tế bào lai được tạo thành được gom lại, nhwof đó tế bào lai đơn dòng có thể thu được. Các khuẩn lạc tế bào lai tương ứng được gom được nuôi cấy và tế bào lai mà đã được nhận biết có độ chuẩn kháng thể ổn định trong dịch nổi nuôi cấy tế bào lai thu được được chọn làm chủng lai tạo ra kháng thể đơn dòng DR5.

Các ví dụ về chủng lai được thiết lập theo cách này bao gồm tế bào lai DR5 B273. Một cách ngẫu nhiên, theo sáng chế, kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai B273 được gọi là “kháng thể B273” hoặc đơn giản là “B273”. Chuỗi nặng của kháng thể B273 có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự. Hơn nữa, chuỗi nhẹ của kháng thể B273 có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự. Một cách ngẫu nhiên, trong trình tự axit amin chuỗi nặng được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 là vùng biến đổi và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 142 đến 465 là vùng cố định. Hơn nữa, trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 133 là vùng biến đổi và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 134 đến 238 là vùng cố định.

Trình tự axit amin chuỗi nặng được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7

trong danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 424 đến 1395 mã hóa vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể.

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 399 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 400 đến 714 mã hóa vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể.

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

Bằng cách nuôi cấy tế bào lai được chọn lọc, kháng thể đơn dòng có thể thu được một cách hiệu quả. Tuy nhiên, trước khi nuôi cấy, được ưu tiên để thực hiện sàng lọc tế bào lai mà tạo ra kháng thể đơn dòng đích.

Trong việc sàng lọc này, phương pháp đã biết có thể được dùng.

Việc xác định độ chuẩn kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phương pháp ELISA được mô tả trong điểm (b) được mô tả trên đây.

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

Sau khi kết thúc tạo đơn dòng, môi trường được thay đổi từ môi trường HT thành môi trường thông thường và nuôi cấy tế bào lai.

Nuôi cấy trên quy mô lớn được thực hiện bằng cách nuôi cấy quay bằng cách sử dụng chai nuôi cấy lớn hoặc nuôi cấy dạng máy quay. Từ dịch nổi thu được nhờ nuôi cấy trên quy mô lớn, kháng thể đơn dòng mà gắn kết đặc hiệu với protein

theo sáng chế có thể thu được bằng cách tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này như lọc gel.

Hơn nữa, tế bào lai được tiêm vào khoang bụng của chuột của chủng tương tự như tế bào lai (ví dụ, BALB/c được mô tả trên đây) hoặc chuột Nu/Nu để tăng sinh tế bào lai, nhờ đó cổ trướng chứa một lượng lớn kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể thu được.

Trong trường hợp mà trong đó tế bào lai được dùng trong khoang bụng, nếu dầu khoáng như 2,6,10,14-tetrametyl pentadecan (pristan) được dùng trước (từ 3 đến 7 ngày trước khi) dùng tế bào lai, một lượng lớn cổ trướng có thể thu được.

Ví dụ, chất ngăn chặn miễn dịch được tiêm trước vào khoang bụng của chuột thuộc chủng tương tự như tế bào lai để làm bất hoạt tế bào T. 20 ngày sau đó, từ 10^6 đến 10^7 tế bào đơn dòng lai được tạo huyền phù trong môi trường không có huyết thanh (0,5ml), và huyền phù được tiêm vào khoang bụng của chuột. Thông thường, khi bụng được phồng ra và được làm đầy với cổ trướng, cổ trướng được gom từ chuột. Theo phương pháp này, kháng thể đơn dòng có thể thu được ở nồng độ gấp khoảng 100 lần hoặc cao hơn nồng độ trong dung dịch nuôi cấy.

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

Kháng thể đơn dòng thu được theo cách này có tính đặc hiệu kháng nguyên cao đối với DR5.

(h) Thử nghiệm kháng thể đơn dòng

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

Thứ nhất, các ví dụ về phương pháp nhận biết bao gồm phương pháp Ouchterlony, phương pháp ELISA và phương pháp RIA.

Phương pháp Ouchterlony là đơn giản, nhưng khi nồng độ của kháng thể đơn dòng thấp, thì cần phải tiến hành cô đặc.

Mặt khác, khi phương pháp ELISA hoặc phương pháp RIA được sử dụng, bằng cách cho dịch nổi nuôi cấy phản ứng trực tiếp với pha rắn hấp thụ kháng nguyên và sử dụng kháng thể tương ứng với các loại khác nhau của isotyp globulin miễn dịch và các nhóm phụ làm kháng thể thứ hai, isotyp và nhóm phụ kháng thể đơn dòng có thể được nhận biết.

Ngoài ra, đối với phương pháp đơn giản hơn, kit nhận biết hiện bán sẵn trên thị trường (ví dụ, Mouse Typer Kit được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) hoặc tương tự cũng có thể được sử dụng.

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

Hơn nữa, thậm chí khi kháng thể đơn dòng thu được một cách riêng rẽ và một cách độc lập bằng cách thực hiện lại các bước từ (a) đến (h) trong điểm (2) trên đây, có thể thu được kháng thể có hoạt tính độc tế bào tương đương với hoạt tính của B273. Theo một ví dụ về kháng thể, kháng thể mà gắn kết với epitop giống như kháng thể B273 có thể được lấy làm ví dụ. Nếu kháng thể đơn dòng được tạo ra mới gắn kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc bậc ba riêng phần mà kháng thể B273 gắn kết, có thể xác định được rằng kháng thể đơn dòng gắn kết với epitop giống như kháng thể B273. Hơn nữa, bằng cách thừa nhận rằng kháng thể đơn dòng cạnh tranh với kháng thể B273 để gắn kết với DR5 (tức là, kháng thể đơn dòng ức chế gắn kết giữa kháng thể B273 và DR5), có thể xác định được rằng kháng thể đơn dòng gắn kết với epitope giống như kháng thể B273 thậm chí nếu trình tự epitop hoặc cấu trúc đặc hiệu vẫn chưa được xác định. Trong trường hợp mà trong đó kháng thể đơn dòng gắn kết với epitop giống như kháng thể B273, kháng thể đơn dòng rất được mong đợi có hoạt tính độc tế bào tương đương với hoạt tính của B273.

Hơn nữa, như được thể hiện trong ví dụ 4, có thể xác định rõ gốc axit amin trên một phía DR5 mà nằm liền kề với mảnh Fab của kháng thể từ dữ liệu nhiễu xạ tia X của phức hợp giữa mảnh Fab và DR5. Cụ thể là, trong trường hợp mà trong đó mảnh Fab có nguồn gốc từ kháng thể tùy ý nằm liền kề với gốc glyxin ở vị trí 26, gốc isoleuxin ở vị trí 34, gốc axit glutamic ở vị trí 36, gốc axit aspartic ở vị trí 37, gốc glyxin ở vị trí 38, gốc axit aspartic ở vị trí 56, gốc leuxin ở vị trí 57, gốc leuxin ở vị trí 58, gốc phenylalanin ở vị trí 59, gốc leuxin ở vị trí 61, và gốc arginin ở vị trí 62 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23 trong danh mục trình tự, ở khoảng cách 4Å hoặc nhỏ hơn, có thể xác định được rằng kháng thể có tính đặc hiệu đối với epitop giống như B273.

(3) Các kháng thể khác

Kháng thể theo sáng chế không chỉ bao gồm kháng thể đơn dòng kháng DR5 được nêu trên đây mà cũng bao gồm kháng thể tái tổ hợp thu được bằng cách biến đổi nhân tạo nhằm mục đích làm giảm tính kháng nguyên khác loại ở con người như kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người và kháng thể người. Các kháng thể này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp đã biết.

Đối với kháng thể khảm, kháng thể mà trong đó các vùng biến đổi và vùng cố định kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác nhau, ví dụ, kháng thể khảm trong đó vùng biến đổi kháng thể có nguồn gốc từ chuột nhắt hoặc chuột cống được kết hợp với vùng cố định có nguồn gốc từ người có thể được lấy làm ví dụ (xem Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)). Kháng thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể B273 chuột kháng người DR5 là kháng thể bao gồm chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 20 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 16, và có thể có vùng cố định tùy ý. Một ví dụ về kháng thể khảm, kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 20

trong danh mục trình tự và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 16 cũng có thể được lấy làm ví dụ. Một cách ngẫu nhiên, trong trình tự chuỗi nặng được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 là vùng biến đổi và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 142 đến 471 là vùng cố định. Hơn nữa, trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 là vùng biến đổi và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 135 đến 239 là vùng cố định.

Trình tự axit amin chuỗi nặng được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 424 đến 1413 mã hóa vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể.

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 403 đến 717 mã hóa vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Kháng thể được làm giống như của người, kháng thể thu được bằng cách chỉ kết hợp các vùng quyết định phân bổ sung (CDR) vào kháng thể có nguồn gốc từ người (xem Nature (1986) 321, pp. 522-525), và kháng thể thu được bằng cách ghép

một phần của các gốc axit amin của khung cũng như trình tự CDR vào kháng thể người bằng phương pháp ghép CDR (WO 90/07861) có thể được lấy làm ví dụ.

Tuy nhiên, kháng thể được làm giống như của người có nguồn gốc từ kháng thể B273 là không bị giới hạn đến kháng thể được làm giống như của người đặc hiệu miễn là kháng thể được làm giống như của người có tất cả 6 kiểu trình tự CDR của B273 và có hoạt tính gây chết tế bào theo lập trình. Một cách ngẫu nhiên, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể B273 có CDRH1 (GYFMN) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 82 trong danh mục trình tự, CDRH2 (RFNPYNGDTFYNQKFKG) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 83, và CDRH3 (SAYYFDSGGYFDY) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 84. Hơn nữa, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể B273 có CDRL1 (RSSQSLVHSNGNTYLH) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 79 trong danh mục trình tự, CDRL2 (KVSNRFS) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80, và CDRL3 (SQSTHVPWT) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81.

Hơn nữa, trình tự bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài gốc axit amin trong một trong các CDR được mô tả trên đây có thể được sử dụng làm trình tự CDR mà kháng thể được biến đổi CDR có nguồn gốc từ kháng thể B273 có. Các ví dụ về trình tự bao gồm thay thế một gốc axit amin trong CDRL1 bao gồm trình tự (RSSQSLVHSNENTYLH) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 85 trong Danh mục trình tự, trình tự (RSSQSLVHSNFNTYLH) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 86, trình tự (RSSQSLVHSNKNTYLH) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 87, và trình tự (RSSQSLVHSNLNTYLH) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 88. Hơn nữa, các ví dụ về trình tự bao gồm thay thế một gốc axit amin trong CDRH2 bao gồm trình tự (RFNPYNEDTFYNQKFKG) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 89.

Thông thường, việc amin hóa khử asparagin trong protein xảy ra thông qua sự tạo thành trạng thái chuyển tiếp của succinimit vòng giữa asparagin và axit amin liền kề ở phía tận cùng C (Geiger, T. và Clarke, S. (1987) Deamidation, Isomerization, và racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. J. Biol. Chem. 262, 785-794). Yếu tố giới hạn tốc độ tạo thành trạng thái chuyển tiếp của succinimit vòng theo kích cỡ chuỗi phụ của axit amin liền kề và do đó, glyxin mà có chuỗi phụ nhỏ nhất có thể đạt được tốc độ amin hóa khử nhanh nhất. Mặt khác, bằng cách thay thế nhóm liền kề ở phía tận cùng C bằng axit amin có chuỗi phụ lớn, tốc độ amin hóa khử có thể được ngăn chặn. Kháng thể B273 có trình tự -N-G- (asparagin-glyxin) mà dễ amin hóa khử trong CDRL1 và CDRH2. Do đó, các tác giả sáng chế đã tạo ra các đột biến điểm trong đó nhóm liền kề được thay đổi từ glyxin thành lysin, phenylalanin, leuxin hoặc axit glutamic, mỗi trong số chúng có chuỗi phụ lớn hơn glyxin. Nghĩa là, trong CDRH2, trình tự -N-G- (asparagin-glyxin) được đột biến thành trình tự -N-E- (asparagin-axit glutamic) và trong CDRL1, trình tự -N-G- (asparagin-glyxin) được đột biến thành trình tự -N-L- (asparagin-leuxin), trình tự -N-F- (asparagin-phenylalanin), trình tự -N-K- (asparagin-lysin) hoặc trình tự -N-E- (asparagin-axit glutamic), nhờ đó sự amin hóa khử kháng thể được ngăn chặn.

Ví dụ về kháng thể có các CDR được mô tả trên đây, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 82 trong danh mục trình tự, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 83, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 84, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 79 trong danh mục trình tự, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81; kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 82 trong danh

mục trình tự, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 89, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 84, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 85 trong danh mục trình tự, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81; kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 82 trong Danh mục trình tự, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 89, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 84, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 86 trong danh mục trình tự, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81; kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 82 trong danh mục trình tự, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 89, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 84, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 87 trong danh mục trình tự, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81; và kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 82 trong danh mục trình tự, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 89, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 84, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 88 trong danh mục trình tự, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81 có thể được lấy làm ví dụ.

Ví dụ về kháng thể được làm giống như của người của kháng thể B273 chuột

(bao gồm kháng thể được biến đổi CDR), kết hợp tùy ý của chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 một trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, và 70 trong danh mục trình tự với chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 28, 30, 32, 52, 58, 62, và 66 có thể được lấy làm ví dụ.

Đối với kết hợp được ưu tiên, kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 30; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 32; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 30; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 32; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng

biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 30; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 32; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 42 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 44 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao

gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 70 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 52; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 70 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 58; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 70 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 62; và kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 70 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 66 có thể được lấy làm ví dụ.

Đối với kết hợp được ưu tiên hơn, kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 34 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 28; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 34 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 30; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 34 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 32; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 28; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ

[illegible]

đến 471 của SEQ ID NO: 70 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 52; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 70 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 58; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 70 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 62; và kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 70 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 66 có thể được lấy làm ví dụ.

Đối với kết hợp được ưu tiên hơn nữa, kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 42 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 70 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 52; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 70 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 58; kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 70 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 62; và kháng thể, khác biệt ở chỗ, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 70 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 66 có thể được lấy làm ví dụ.

Đối với kết hợp được ưu tiên nhất, kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 42 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 28; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 70 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 52; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 70 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 58; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 70 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 62; và kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 70 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO: 66 có thể được lấy làm ví dụ.

Bằng cách kết hợp trình tự có tính tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nặng được mô tả trên đây với trình tự có tính tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nhẹ được mô tả trên đây, có thể chọn lọc kháng thể có tính độc tế bào tương đương với tính độc của mỗi trong số các kháng thể được mô tả trên đây. Tính tương đồng thường là tương đồng 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn là tương đồng 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là tương đồng 95% hoặc lớn hơn, tốt nhất là tương đồng 99% hoặc lớn hơn. Hơn nữa, bằng cách kết hợp trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài gốc axit amin trong trình tự axit amin chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, cũng có thể chọn lọc kháng thể có hoạt tính độc tế bào tương đương với hoạt tính của mỗi trong số các kháng thể được nêu trên đây. Số lượng gốc axit amin được thay thế, bớt hoặc thêm thường là 10 hoặc ít hơn, tốt hơn là từ 5 đến 6 hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là từ 2 đến 3 hoặc ít hơn, tốt nhất là 1.

Tính tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách

sử dụng thuật toán Blast phiên bản 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, và David J. Lipman (1997), “Gapped BLAST và PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402) với các tham số mặc định. Thuật toán Blast cũng có thể được sử dụng qua Internet bằng cách truy cập www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Một cách ngẫu nhiên, hai loại giá trị giống nhau theo tỷ lệ phần trăm (hoặc các sự giống nhau) và sự rõ ràng (hoặc các sự rõ ràng) được tính toán theo thuật toán Blast. Sự giống nhau là giá trị khi các gốc axit amin hợp với nhau vào hai trình tự axit amin mà mức độ tương đồng được xác định và sự rõ ràng là giá trị thu được cũng bằng cách xem xét các gốc axit amin có cấu trúc hóa học tương tự. Theo sáng chế, giá trị giống nhau khi các gốc axit amin hợp với nhau được sử dụng làm giá trị tương đồng.

Một cách ngẫu nhiên, trong trình tự axit amin chuỗi nặng được thể hiện bởi SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 hoặc 70 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 là vùng biến đổi và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 142 đến 471 là vùng cố định. Hơn nữa, trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28, 30, 32, 52, 58, 62 hoặc 66 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 là vùng biến đổi và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 135 đến 239 là vùng cố định.

Trình tự axit amin chuỗi nặng được thể hiện bởi SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 hoặc 70 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 hoặc 69 trong danh mục trình tự. Trong mỗi trình tự nucleotit trên đây, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể, trình tự

nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 424 đến 1413 mã hóa vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể.

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28, 30, 32, 52, 58, 62 hoặc 66 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27, 29, 31, 51, 57, 61 hoặc 65 trong danh mục trình tự. Trong mỗi trình tự nucleotit trên đây, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 403 đến 717 mã hóa vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể.

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

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể người mà gắn kết với cùng epitop như kháng thể B273. Kháng thể kháng DR5 người đề cập đến kháng thể người chỉ có trình tự gen của kháng thể có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể người. Kháng thể kháng DR5 người có thể thu được bằng phương pháp bằng cách sử dụng chuột tạo ra kháng thể người có khung nhiễm sắc thể người chứa các gen chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể người (xem Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic và Applied Aspects* vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, pp. 722-727, etc.).

Chuột tạo ra kháng thể người này có thể được tạo ra một cách cụ thể như sau. Động vật được biến đổi về mặt di truyền trong đó locus gen của chuỗi nặng và nhẹ globulin miễn dịch nội sinh đã bị phá vỡ và thay vào đó, locus gen của chuỗi nặng và

nhẹ globulin miễn dịch của người đã được đưa vào qua vectơ nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC) hoặc tương tự được tạo ra bằng cách tạo ra động vật được làm bất hoạt và động vật chuyển gen và cho các động vật này giao phối với nhau.

Hơn nữa, theo kỹ thuật công nghệ di truyền, bằng cách sử dụng ADN hỗ trợ mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người, tương ứng và tốt hơn là vectơ chứa ADN hỗ trợ, tế bào có nhân thật được biến nạp và thể biến nạp tạo ra kháng thể đơn dòng người tái tổ hợp được nuôi cấy, nhờ đó kháng thể cũng có thể thu được từ dịch nổi nuôi cấy.

Ở đây, đối với vật chủ, ví dụ, tế bào có nhân thật, tốt hơn là tế bào động vật có vú như tế bào CHO, tế bào bạch huyết hoặc tế bào u tủy có thể được sử dụng.

Hơn nữa, phương pháp thu được kháng thể người có nguồn gốc thể hiện thể thực khuẩn được sàng lọc từ thư viện kháng thể người (xem Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.) cũng được biết đến.

Ví dụ, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn trong đó vùng biến đổi của kháng thể người được biểu hiện trên bề mặt của thể thực khuẩn như kháng thể chuỗi đơn (scFv) và thể thực khuẩn gắn kết với kháng nguyên được chọn (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), pp. 1105-1116) có thể được sử dụng.

Bằng cách phân tích gen của thể thực khuẩn được chọn dựa trên sự gắn kết với kháng nguyên, trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của kháng thể người mà gắn kết với kháng nguyên có thể được xác định.

Nếu trình tự ADN của scFv gắn kết với kháng nguyên được xác định, kháng thể người có thể thu được bằng cách tạo ra vectơ biểu hiện có trình tự và đưa vectơ này vào vật chủ thích hợp để biểu hiện nó (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388, *Annu. Rev.*

Immunol. (1994) 12, pp. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

Nếu kháng thể người được tạo ra mới gắn kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc bậc ba riêng phần mà kháng thể B273 gắn kết, có thể xác định được rằng kháng thể người và kháng thể B273 gắn kết với cùng epitop. Hơn nữa, bằng cách xác nhận rằng kháng thể người cạnh tranh với kháng thể B273 để gắn kết với DR5 (tức là, kháng thể người ức chế sự gắn kết giữa kháng thể B273 và DR5), có thể xác định được rằng kháng thể người và kháng thể B273 gắn kết với cùng epitop thậm chí nếu trình tự hoặc cấu trúc epitop đặc hiệu không được xác định. Khi đã xác nhận được rằng kháng thể người và kháng thể B273 gắn kết với cùng epitop, kháng thể người rất được mong đợi có hoạt tính độc tế bào tương đương với hoạt tính của B273.

Hơn nữa, như được thể hiện trong ví dụ 4, có thể xác định rõ gốc axit amin ở phía DR5 mà nằm liền kề với mảnh Fab của kháng thể từ dữ liệu nhiễu xạ tia X của phức hợp giữa mảnh Fab và DR5. Cụ thể là, trong trường hợp trong đó mảnh Fab có nguồn gốc từ kháng thể tùy ý nằm liền kề với gốc glyxin ở vị trí 26, gốc isoleuxin ở vị trí 34, gốc axit glutamic ở vị trí 36, gốc axit aspartic ở vị trí 37, gốc glyxin ở vị trí 38, gốc axit aspartic ở vị trí 56, gốc leuxin ở vị trí 57, gốc leuxin ở vị trí 58, gốc phenylalanin ở vị trí 59, gốc leuxin ở vị trí 61 và gốc arginin ở vị trí 62 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23 trong danh mục trình tự, ở khoảng cách 4Å hoặc nhỏ hơn, có thể xác định được rằng kháng thể gắn kết với cùng epitop như B273.

Các kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể người thu được bằng phương pháp được mô tả trên đây được đánh giá đối với đặc tính gắn kết với kháng nguyên bằng phương pháp được thể hiện trong ví dụ 3 hoặc tương tự và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn. Đối với một ví dụ về chỉ số khác để sử dụng trong so sánh các đặc tính của kháng thể, tính ổn định của kháng thể có thể được lấy làm ví dụ. Nhiệt lượng kế quét vi sai (DSC) được thể hiện trong

ví dụ 10 là thiết bị có khả năng xác định nhanh chóng và chính xác nhiệt độ trung điểm biến tính do nhiệt (T_m) được sử dụng làm chỉ số thích hợp của tính ổn định protein thích ứng tương đối. Bằng cách xác định giá trị T_m bằng cách sử dụng DSC và so sánh các giá trị, sự khác nhau về tính ổn định nhiệt có thể được so sánh. Đã biết được rằng tính ổn định bảo quản của kháng thể thể hiện một số mối tương quan với tính ổn định nhiệt của kháng thể (Lori Burton, et. al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, pp. 265-273), và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn bằng cách sử dụng tính ổn định nhiệt làm chỉ số. Các ví dụ về các chỉ số khác để chọn lọc kháng thể bao gồm các yếu tố sau đây: hiệu xuất trong tế bào chủ thích hợp cao và khả năng kết tập trong dung dịch trong nước là thấp. Ví dụ, kháng thể mà thể hiện hiệu xuất cao nhất không luôn luôn thể hiện tính ổn định nhiệt cao nhất và do đó, cần phải chọn lọc kháng thể thích hợp nhất để dùng cho người bằng cách tiến hành đánh giá toàn diện dựa trên các chỉ số được mô tả trên đây.

Hơn nữa, phương pháp trong đó toàn bộ chiều dài trình tự chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể được kết nối bằng cách sử dụng cầu nối thích hợp, nhờ đó globulin miễn dịch chuỗi đơn thu được cũng đã được biết đến (Lee, H-S, et. al., *Molecular Immunology* (1999) 36, pp. 61-71; Shirrmann, T. et. al., *mAbs* (2010), 2, (1) pp. 1-4). Bằng cách dime hóa globulin miễn dịch chuỗi đơn, dime thu được có thể có cấu trúc và hoạt tính tương tự với cấu trúc và hoạt tính của kháng thể mà tự bản thân là tetrame. Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế mà có vùng biến đổi chuỗi nặng đơn và không có trình tự chuỗi nhẹ. Kháng thể này được gọi là kháng thể miễn đơn (sdAb) hoặc nanobody và trong thực tế, kháng thể này quan sát được ở lạc đà và lạc đà không bướu và đã được báo cáo có ái lực gắn kết kháng nguyên (Muyldemans S. et. al., *Protein Eng.* (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et. al., *Nature* (1993) 363 (6428) 446-8). Các kháng thể được mô tả trên đây được bao gồm trong kháng thể theo sáng chế.

Hơn nữa, bằng cách kiểm soát glycosyl hóa trong đó glycan được gắn kết

với kháng thể theo sáng chế, có thể làm tăng cường hoạt tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Đối với kỹ thuật kiểm soát glycosyl hóa kháng thể, WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, v.v là đã được biết đến. Tuy nhiên, không bị giới hạn đến các kỹ thuật này.

Trong trường hợp trong đó kháng thể được tạo ra bằng cách thứ nhất phân lập gen kháng thể và sau đó đưa gen này vào vật chủ thích hợp, sự kết hợp vật chủ thích hợp và vector biểu hiện thích hợp có thể được sử dụng. Các ví dụ cụ thể về gen kháng thể bao gồm kết hợp gen mã hóa trình tự chuỗi nặng của kháng thể được mô tả theo sáng chế và gen mã hóa trình tự chuỗi nhẹ của nó. Khi tế bào chủ được biến nạp, có thể lồng gen trình tự chuỗi nặng và gen trình tự chuỗi nhẹ vào vector biểu hiện và cũng vào các vector biểu hiện khác nhau một cách riêng rẽ. Trong trường hợp trong đó tế bào có nhân thật được sử dụng làm vật chủ, tế bào động vật, tế bào thực vật và vi sinh vật có nhân thật có thể được sử dụng. Đối với tế bào động vật, (1) tế bào động vật có vú, ví dụ, các chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) of simian COS cells (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), nguyên bào sợi của chuột NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO; ATCC: CCL-61) có thể được lấy làm ví dụ. Hơn nữa, trong trường hợp trong đó tế bào chưa có nhân thật được sử dụng, ví dụ, *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* có thể được lấy làm ví dụ. Bằng cách đưa gen kháng thể đích vào tế bào chủ thông qua biến nạp và nuôi cấy tế bào được biến nạp *in vitro* này, kháng thể có thể thu được. Theo phương pháp nuôi cấy được mô tả trên đây, hiệu suất đôi khi có thể thay đổi phụ thuộc vào kháng thể và do đó, có thể chọn lọc kháng thể mà được tạo ra dễ dàng làm thuốc bằng cách sử dụng hiệu suất làm chỉ số trong số các kháng thể có hoạt tính gắn kết có thể so sánh.

Không có giới hạn nào đối với isotyp của kháng thể theo sáng chế và các ví dụ của nó bao gồm IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD, và

IgE, và các ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm IgG và IgM, và các ví dụ được ưu tiên hơn nữa bao gồm IgG1 và IgG2.

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể là mảnh chức năng của kháng thể có vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể hoặc mảnh được biến đổi của nó. Mảnh kháng thể có thể thu được bằng cách xử lý kháng thể với proteaza như papain hoặc pepsin hoặc làm biến đổi gen kháng thể theo kỹ thuật công nghệ di truyền và biểu hiện gen được biến đổi này trong tế bào nuôi cấy thích hợp. Trong số các mảnh kháng thể này, mảnh có tất cả hoặc một phần chức năng của toàn bộ chiều dài phân tử kháng thể có thể được gọi là mảnh chức năng của kháng thể. Đối với chức năng của kháng thể, thường là hoạt tính gắn kết kháng nguyên, hoạt tính làm trung hòa hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính làm tăng cường hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể, hoạt tính độc tế bào phụ thuộc phân bổ sung và hoạt tính độc tế bào phụ thuộc phân bổ sung có thể được lấy làm ví dụ. Chức năng của mảnh chức năng của kháng thể theo sáng chế là hoạt tính gắn kết với DR5, tốt hơn là hoạt tính gây chết tế bào theo lập trình ở tế bào, tốt hơn nữa là hoạt tính độc tế bào thông qua gây chết tế bào theo lập trình ở tế bào ung thư. Tuy nhiên, kháng thể theo sáng chế có thể có hoạt tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể, hoạt tính độc tế bào phụ thuộc phân bổ sung và/hoặc hoạt tính độc tế bào phụ thuộc phân bổ sung cũng như hoạt tính gây chết tế bào theo lập trình ở tế bào.

Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm Fab, F(ab')₂, Fv, Fv chuỗi đơn (scFv) trong đó các phân tử Fv của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được kết nối qua cầu nối thích hợp, diabody (các diabody), kháng thể tuyến tính và kháng thể đa đặc hiệu bao gồm mảnh kháng thể. Hơn nữa, Fab' là mảnh có hóa trị một trong vùng biến đổi của kháng thể thu được bằng cách xử lý F(ab')₂ trong các điều kiện khử cũng được bao gồm trong mảnh kháng thể.

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa đặc hiệu với tính đặc hiệu đối với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau. Nói chung, phân tử này gắn kết

với hai kháng nguyên (tức là, kháng thể đặc hiệu kép), tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể đa đặc hiệu” như được sử dụng ở đây bao gồm kháng thể có tính đặc hiệu đối với hai hoặc nhiều (ví dụ, ba) kháng nguyên.

Kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế có thể là toàn bộ chiều dài kháng thể hoặc mảnh của kháng thể này (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép $F(ab')_2$). Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách kết nối các chuỗi nặng và nhẹ (cặp HL) của hai loại kháng thể hoặc cũng có thể được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào lai mà tạo ra các kháng thể đơn dòng khác nhau để tạo ra tế bào được dung hợp tạo ra kháng thể đặc hiệu kép (Millstein et al., *Nature* (1983) 305, pp. 537-539).

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể chuỗi đơn (cũng được gọi là scFv). Kháng thể chuỗi đơn có thể thu được bằng cách kết nối vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể qua cầu nối polypeptit (Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113 (edited by Rosenberg and Moore), Springer Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), *Nature Biotechnology* (2005), 23, pp. 1126-1136). Hơn nữa, mảnh BiscFv được tạo ra bằng cách kết nối hai phân tử scFv qua cầu nối polypeptit cũng có thể được sử dụng như kháng thể đặc hiệu kép.

Phương pháp sản xuất kháng thể chuỗi đơn là đã được biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, các patent Mỹ số 4,946,778, 5,260,203, 5,091,513, 5,455,030, v.v). Trong scFv này, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được kết nối qua cầu nối mà không tạo thành cầu nối tiếp hợp, tốt hơn là qua cầu nối polypeptit (Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988), 85, pp. 5879-5883). Trong scFv, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ cùng kháng thể hoặc các kháng thể khác nhau.

Đối với cầu nối polypeptit được sử dụng để kết nối các vùng biến đổi, peptit chuỗi đơn thu được bao gồm từ 12 đến 19 gốc được sử dụng, chẳng hạn.

ADN mã hóa scFv có thể thu được bằng cách tiến hành khuếch đại bằng cách sử dụng ADN mã hóa toàn bộ trình tự axit amin hoặc trình tự axit amin riêng

phần mong muốn của ADN được chọn từ ADN mã hóa chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được mô tả trên đây và ADN mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó làm khung bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi mà xác định cả hai đầu của nó và còn tiến hành khuếch đại bằng cách kết hợp ADN mã hóa phần cầu nối polypeptit và cặp đoạn mồi mà xác định cả hai đầu của nó sao cho kết nối cả hai đầu với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, tương ứng.

Hơn nữa, một ADN mã hóa scFv được tạo ra, vector biểu hiện chứa nó và vật chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện có thể thu được theo quy trình chung. Hơn nữa, bằng cách sử dụng vật chủ thu được, scFv có thể thu được theo quy trình chung. Mảnh kháng thể của nó có thể được tạo ra ở vật chủ bằng cách thu được gen và biểu hiện gen này theo cách tương tự như được mô tả trên đây.

Kháng thể theo sáng chế có thể được tạo đa để gia tăng ái lực của nó đối với kháng nguyên. Kháng thể được tạo đa này có thể là một loại kháng thể hoặc nhiều kháng thể mà nhận biết nhiều epitop của cùng kháng nguyên. Đối với phương pháp đa hóa kháng nguyên, sự gắn kết của miền IgG CH3 với hai phân tử scFv, gắn kết với streptavidin, đưa vào motif xoắn-vòng-xoắn và tương tự có thể được lấy làm ví dụ.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa dòng mà là hỗn hợp của nhiều loại kháng thể kháng DR5 có các trình tự axit amin khác nhau. Một ví dụ về kháng thể đa dòng, hỗn hợp gồm nhiều loại kháng thể có CDR khác nhau có thể được lấy làm ví dụ. Đối với kháng thể đa dòng, các kháng thể thu được bằng cách nuôi cấy hỗn hợp tế bào mà tạo ra các kháng thể khác nhau và sau đó tinh chế các kháng thể này từ môi trường thu được có thể được sử dụng (xem WO 2004/061104).

Đối với kháng thể được biến đổi, kháng thể được gắn kết với bất kỳ trong số các loại phân tử khác nhau như polyetylen glycol (PEG) cũng có thể được sử dụng.

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể ở dạng tiếp hợp được tạo thành giữa bất kỳ trong số các kháng thể này và thuốc khác (tiếp hợp miễn dịch). Các ví dụ

về kháng thể này bao gồm kháng thể trong đó kháng thể được tiếp hợp với nguyên liệu phóng xạ hoặc hợp chất có tác dụng dược lý (Nature Biotechnology (2005) 23, pp. 1137-1146).

Kháng thể thu được có thể được tinh chế thành đồng nhất. Việc tách và tinh chế kháng thể có thể được thực hiện bằng cách dùng phương pháp tách và tinh chế protein thông thường. Ví dụ, kháng thể có thể được tách và tinh chế bằng cách sắc ký chọn lọc thích hợp và sắc ký cột kết hợp, lọc bằng dụng cụ lọc, siêu lọc, kết tinh muối, thẩm tách điện di gel polyacrylamit điều chế, điện di tiêu điểm đẳng điện và tương tự (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), nhưng phương pháp này là không bị giới hạn đến các phương pháp này.

Các ví dụ về sắc ký này bao gồm sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký lọc gel, sắc ký pha ngược và sắc ký hấp phụ.

Việc sắc ký này có thể được thực hiện bằng cách dùng sắc ký chất lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Đối với cột được sử dụng trong sắc ký ái lực, cột Protein A và cột Protein G có thể được lấy làm ví dụ.

Ví dụ, đối với cột bằng cách sử dụng cột Protein A, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) và tương tự có thể được lấy làm ví dụ. Hơn nữa, bằng cách sử dụng chất mang có kháng nguyên được cố định trên đó, kháng thể cũng có thể được tinh chế bằng cách sử dụng đặc tính gắn kết của kháng thể với kháng nguyên.

(4) Các ví dụ đặc hiệu của kháng thể kháng DR5

Các kháng thể kháng DR5 mà gây chết tế bào theo lập trình trong tế bào biểu hiện DR5 được mô tả trong, ví dụ, WO 98/51793, WO 2001/83560, WO 2002/94880,

WO 2003/54216, WO 2006/83971, và WO 2007/22157. Hơn nữa, các kháng thể kháng DR5 được gọi là tigatuzumab (CS-1008), lexatumumab (HGS-ETR2), HGS-TR2J, drozitumab (APOMAB), conatumumab (AMG-655), và LBY135 vẫn trong thử nghiệm lâm sàng hoặc trong các thử nghiệm lâm sàng trước. Các kháng thể kháng DR5 mà vẫn trong các thử nghiệm lâm sàng vào ngày khi đơn sáng chế này được nộp là tigatuzumab, lexatumumab, và conatumumab. Các kháng thể kháng DR5 mới được mô tả trong sáng chế có hoạt tính kháng khối u *in vitro* và/hoặc *in vivo* tốt hơn như được so với tigatuzumab, lexatumumab, conatumumab, và drozitumab được mô tả trên đây.

3. Dược phẩm chứa kháng thể kháng DR5

Các kháng thể thu được bằng phương pháp được mô tả trong điểm “2 trên đây. Việc sản xuất kháng thể kháng DR5” có thể được sử dụng làm dược phẩm, cụ thể là chất điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư do mỗi chức năng kháng thể làm chủ vận đối với thụ thể liên quan gây chết tế bào theo lập trình, DR5, *in vivo* và gây chết tế bào theo lập trình ở tế bào ung thư qua thụ thể thể hiện hoạt tính độc tế bào.

Hoạt tính độc tế bào được thể hiện bởi kháng thể *in vitro* có thể được xác định bằng cách xác định hoạt tính của chúng trong việc ức chế tăng sinh tế bào mà biểu hiện hiệu quả mức thụ thể liên quan gây chết tế bào.

Ví dụ, dòng tế bào ung thư mà biểu hiện quá mức DR5 được nuôi cấy, kháng thể được bổ sung vào hệ nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau và hoạt tính ức chế đối với sự tạo thành mục tiêu, tạo thành khuẩn lạc và tăng sinh hình cầu có thể được xác định.

Hiệu quả điều trị *in vivo* của kháng thể đối với bệnh ung thư bằng cách sử dụng các động vật thử nghiệm có thể được xác định, ví dụ, bằng cách xác định sự thay đổi trong tế bào ung thư bằng cách đo chuột trụi lông được ghép dòng tế bào khối u mà biểu hiện quá mức DR5 dùng kháng thể.

Các ví dụ về loại bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư

tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tử cung bao gồm ung thư màng trong dạ con, ung thư hắc tố bao gồm khối u ác tính, sarcom sụn, u nguyên bào đệm, ung thư tế bào máu (như bệnh bạch cầu và u bạch huyết), tuy nhiên, loại bệnh ung thư là không bị giới hạn đến các bệnh này miễn là tế bào ung thư được xử lý biểu hiện DR5.

Hơn nữa, đã biết được rằng kháng thể kháng DR5 gây chết tế bào theo lập trình ở các tế bào viêm (J. Clin. Invest. 1996, 98 (2), 271-278; Int. Immunol. 1996, 8 (10), 1595-1602). Do đó, kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm chất điều trị đối với các bệnh tự miễn dịch hoặc bệnh viêm. Ví dụ về bệnh tự miễn dịch hoặc bệnh viêm bao gồm bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh Hashimoto, viêm khớp dạng thấp, bệnh vật chủ thải loại mảnh ghép, hội chứng Sjogren, bệnh thiếu máu nguy hại, bệnh Addison, bệnh cứng da, hội chứng Goodpasturem, bệnh Crohn, bệnh thiếu máu do tan máu tự miễn dịch, bệnh vô sinh, bệnh nhược cơ năng, đa xơ cứng, bệnh Basedow, xuất huyết do giảm lượng tiểu cầu, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin, dị ứng, bệnh hen, bệnh dị ứng, chứng xơ cứng động mạch, viêm cơ tim, bệnh cơ tim, viêm tiểu cầu thận, thiếu máu không tái tạo và thải loại sau khi ghép cơ quan.

Chất được sử dụng trong bào chế có thể chấp nhận trong dược phẩm theo sáng chế tốt hơn là không độc đối với người mà dược phẩm được dùng theo liều và nồng độ.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa chất cho sử dụng trong dược phẩm mà có khả năng làm thay đổi hoặc duy trì độ pH, áp suất thẩm thấu, tính nhớt, độ trong suốt, màu sắc, tính đẳng trương, điều kiện tiệt trùng, tính ổn định, tính hòa tan, tốc độ giải phóng, tốc độ hấp thụ và tính thấm được của nó. Các ví dụ về chất này để sử dụng trong dược phẩm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các axit amin như glyxin, alanin, glutamin, asparagin, arginin và lysin; các chất kháng vi sinh vật; các chất chống oxy hóa như axit ascorbic, natri sulfat và natri hydro sulfite; các chất đệm

như phosphat, xitrat, chất đệm borat, natri hydro carbonat, và dung dịch Tris-HCl; các chất làm đầy như manitol và glyxin; các chất tạo chelat như etylendiamin tetraaxetat (EDTA); các chất tạo phức hợp như cafein, polyvinylpyrolidin, β -cyclodextrin và hydroxypropyl- β -cyclodextrin; các chất nở như glucoza, mannoza và dextrin; các carbohydrat khác như monosacarit và disacarit; các chất tạo màu; chất tạo hương; chất pha loãng; chất tạo nhũ hóa; các polyme có thể thấm nước như polyvinylpyrolidin; các chất bảo quản như các polypeptit trọng lượng phân tử thấp, các ion đệm tạo muối, benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salixylic, thimerosal, rượu phenetyl, metylparaben, propylparaben, chlorhexidin, axit sorbic và hydro peroxit; các dung môi như glyxerin, propylen glycol, và polyetylen glycol; rượu đường như manitol và sorbitol; các chất tạo huyền phù; các chất có hoạt tính bề mặt như sorbitan este, polysorbat bao gồm polysorbat 20 và polysorbat 80, Triton, tromethamin, lexitin và cholesterol; các chất làm tăng cường tính ổn định như sucroza và sorbitol; chất tăng cường tính đàn hồi như natri clorua, kali clorua và manitol và sorbitol; các chất vận chuyển; các chất phụ trợ; và/hoặc các tá dược. Lượng của các chất này để sử dụng trong dược phẩm tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100 lần, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 lần trọng lượng kháng thể kháng DR5. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định thích hợp cách bào chế dược phẩm được ưu tiên trong chế phẩm phụ thuộc vào bệnh mà chế phẩm được áp dụng, đường dùng được áp dụng hoặc tương tự.

Tá dược hoặc chất mang trong dược phẩm có thể ở dạng lỏng hoặc rắn. Tá dược hoặc chất mang thích hợp có thể là nước có thể tiêm, nước muối sinh lý, dịch não tủy nhân tạo hoặc chất khác thường được sử dụng để dùng ngoài đường tiêu hóa. Hơn nữa, nước muối sinh lý trung tính hoặc nước muối sinh lý chứa albumin huyết thanh cũng có thể được sử dụng làm chất mang. Dược phẩm có thể chứa chất đệm Tris có độ pH từ 7,0 đến 8,5, chất đệm axetat có độ pH từ 4,0 đến 5,5, hoặc chất đệm xitrat có độ pH từ 3,0 đến 6,2. Hơn nữa, chất đệm này có thể được bổ sung với

sorbitol hoặc hợp chất khác.

Các ví dụ về dược phẩm theo sáng chế bao gồm dược phẩm chứa kháng thể kháng DR5 và dược phẩm chứa kháng thể kháng DR5 và ít nhất một chất điều trị bệnh ung thư. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng sản phẩm được làm khô lạnh hoặc dạng lỏng như thuốc có chế phẩm được chọn và độ sạch cần thiết. Dược phẩm chứa kháng thể kháng DR5 và dược phẩm chứa kháng thể kháng DR5 và ít nhất một chất điều trị bệnh ung thư cũng có thể được tạo thành sản phẩm được làm khô lạnh bằng cách sử dụng chất phụ trợ thích hợp như sucroza.

Trong dược phẩm được mô tả trên đây, chất điều trị bệnh ung thư được kết hợp cùng với kháng thể kháng DR5 có thể được dùng đồng thời với, riêng rẽ hoặc theo trình tự với kháng thể kháng DR5, hoặc chất điều trị và kháng thể kháng DR5 có thể được dùng ở các khoảng thời gian dùng liều khác nhau. Các ví dụ về chất điều trị bệnh ung thư bao gồm abraxan, carboplatin, cisplatin, gemcitabin, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastin, 5-FU, và các chất dùng trong y tế được mô tả trong WO 2003/038043, tuy nhiên, chất không bị giới hạn đến các chất này miễn là chất là chất dùng trong y tế có hoạt tính kháng khối u.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa hoặc để hấp thụ qua dạ dày-ruột qua việc dùng qua đường miệng. Chế phẩm và nồng độ chế phẩm có thể được xác định phụ thuộc vào phương pháp dùng. Ái lực cao hơn của kháng thể kháng DR5 được chứa trong dược phẩm theo sáng chế đối với DR5, tức là, hằng số phân ly của nó thấp (giá trị K_d) đối với DR5, nhiều kháng thể kháng DR5 có thể thể hiện hiệu quả được của nó thậm chí khi giảm liều đối với con người. Ở đây, liều dược phẩm theo sáng chế dùng cho con người cũng có thể được xác định dựa trên thực tiễn này. Đối với liều, trong trường hợp trong đó kháng thể kháng DR5 của người được dùng cho con người, kháng thể này có thể được dùng với liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/kg một lần/từ một ngày đến 180 ngày.

Các ví dụ về dạng liều dược phẩm theo sáng chế bao gồm tiêm bao gồm

truyền, thuốc đạn, chất để xông, chất dùng dưới lưỡi và chất hấp thụ dưới da.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách cụ thể kèm tham chiếu đến các ví dụ, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn đến các ví dụ này. Cần lưu ý rằng các hoạt động tương ứng liên quan đến thao tác các gen trong các ví dụ sau đây được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong "Molecular Cloning" (được soạn thảo bởi Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., được công bố bởi Cold Spring Harbor Laboratory Press in 1989), hoặc trong trường hợp sử dụng chất phản ứng hoặc kit có bán sẵn trên thị trường, chúng được sử dụng theo chương trình được gắn kèm theo đây trừ phi có quy định khác.

Ví dụ 1: Sản xuất kháng thể chuột B273

1)-1 Sản xuất DR5 protein của người (protein miền ngoại bào DR5 của người/protein dung hợp Fc của người)

1)-1-1 Sản xuất vector biểu hiện miền ngoại bào DR5 người

Vector biểu hiện DR5 protein của người (isoform 2: NP_671716) được tạo cấu trúc bằng cách lồng gen, trong đó miền ngoại bào DR5 của người được dung hợp với vùng IgG1/Fc của người, theo hướng xuôi của đoạn khởi đầu CMV.

1)-1-2 Sản xuất DR5 protein của người

Việc đưa vector biểu hiện vào tế bào 293 FreeStyle và thu gom dịch nổi nuôi cấy được thực hiện bởi Invitrogen Corporation (hiện nay là Life Technologies Japan Ltd.).

1)-1-3 Tinh chế DR5 protein của người

Dịch nổi nuôi cấy thu được trong điểm b) trên đây được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký cột ái lực Protein A. 5L dịch nổi nuôi cấy được áp dụng vào "HiTrap Protein AFF" (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., Cat. No. 17-5079-01) được làm cân bằng với PBS, tiếp theo rửa bằng PBS. Sau đó, thêm 2M dung dịch arginin (độ pH = 4,0) vào cột này và phần chứa DR5 protein của người được gom lại. Thêm

phần này vào dụng cụ lọc ly tâm (Amicon Ultra-4, fractional molecular weight: 10 K, Millipore Co., Ltd.), và thay thế chất lỏng bằng PBS và tiến hành cô đặc. Thể tích cuối cùng được cô đặc đến 6ml, mà được sử dụng làm mẫu tinh chế (rDR5-hFc). Xác định định lượng sản phẩm protein được tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng “Micro BCA Protein Assay Kit” (PIERCE #23235). Tiêu chuẩn tham chiếu, “Albumin Standard” được chứa trong kit được sử dụng.

1)-2 Tạo miễn dịch

Chuột BALB/cAJcl (CLEA Japan, Inc.) ở từ 5 đến 6 tuần tuổi được sử dụng. Vào ngày 0, hỗn hợp gồm 50 μ g rDR5-hFc được tạo ra trong điểm 1)-1-3 và tá được đầy đủ Freund (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (ở tỷ lệ thể tích 1:1) được dùng dưới da vào vùng cổ của mỗi chuột. Vào các ngày 14 và 28, hỗn hợp gồm 50 μ g rDR5-hFc và tá được không đầy đủ Freund (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (ở tỷ lệ thể tích 1:1) được dùng dưới da vào vùng lưng của mỗi chuột. Vào ngày 42, 50 μ g rDR5-hFc được cho dùng vào khoang bụng của mỗi chuột và vào ngày 45, cắt lá lách ra khỏi mỗi chuột và được sử dụng để tạo ra tế bào lai.

1)-3 Sản xuất tế bào lai

Tế bào lá lách và tế bào u tủy P3X63Ag8U.1 chuột được cho vào dung hợp tế bào bằng cách sử dụng PEG 4000 (được sản xuất bởi Immuno-biological Laboratories Co., Ltd.), và pha loãng tế bào dung hợp thu được bằng ClonaCell-HY Selection Medium D (được sản xuất bởi StemCell Technologies, Inc., #03804) và nuôi cấy. Sau đó, gom các khuẩn lạc tế bào lai tạo thành, nhờ đó tạo ra tế bào lai đơn dòng. Nuôi cấy riêng rẽ các khuẩn lạc tế bào lai được gom này và bằng cách sử dụng dịch nổi nuôi cấy thu được của mỗi tế bào lai, tế bào lai tạo ra kháng thể kháng DR5 được sàng lọc.

1)-4 Sàng lọc kháng thể bằng phương pháp ELISA tế bào

1)-4-1 Tạo cấu trúc vector biểu hiện đột biến DR5 của người (pcDNA3.1-DR5M)

ADN bổ trợ mã hóa DR5 protein của người (isoform 2: NP_671716) được tạo dòng vô tính vào vector pcDNA3.1(+) và vector biểu hiện biến đổi miền chết pcDNA3.1-DR5M mà được xác định để biểu hiện protein trong đó L axit amin ở vị trí 334 trong miền chết được thay thế bằng D được tạo cấu trúc.

1)-4-2 Sản xuất tế bào biểu hiện gen kháng nguyên

Tế bào HEK 293 được tạo ra ở $7,5 \times 10^5$ tế bào/ml trong môi trường DMEM chứa 10% FBS. Sau đó, chuyển nhiễm tế bào HEK 293 với vector biểu hiện DR5 biến đổi miền chết pcDNA3.1-DR5M hoặc pcDNA3.1-mô phỏng có tác dụng làm đối chứng bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (được sản xuất bởi Life Technologies Japan Ltd.), và phân tán mỗi huyền phù tế bào ở 50 μ l/giếng trong nửa diện tích vi đĩa 96 giếng (được sản xuất bởi Corning Incorporated). Nuôi cấy tế bào qua đêm trong môi trường DMEM chứa 10% FBS dưới các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Tế bào được chuyển nhiễm thu được theo cách này ở trạng thái dính bám được sử dụng như trong ELISA tế bào.

1)-4-3 ELISA tế bào

Sau khi dịch nổi được tách khỏi môi trường nuôi cấy tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với vector biểu hiện được tạo ra trong điểm 1)-4-2, dịch nổi nuôi cấy tế bào lai được bổ sung vào mỗi tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với pcDNA3.1-DR5M và tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với pcDNA3.1-mô phỏng và để yên đĩa ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, rửa tế bào trong mỗi giếng một lần bằng PBS chứa 5% FBS, IgG dê kháng chuột, peroxidaza được tiếp hợp (được sản xuất bởi Chemicon Co., Ltd., #AP181P) được pha loãng đến 500 lần bằng PBS chứa 5% FBS được bổ sung vào mỗi giếng và để yên đĩa ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, rửa tế bào trong mỗi giếng 5 lần bằng PBS chứa 5% FBS, dung dịch hiện màu OPD (o-phenylendiamin dihydroclorua (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và H₂O₂ được hòa tan ở 0,4mg/ml và 0,6% (thể tích), tương ứng, trong dung dịch để hòa tan OPD (0,05 M trinati xitrat và 0,1M dinatri hydro phosphat

dodecahydrat, độ pH = 4,5)) được bổ sung ở 25µl/giếng. Phản ứng hiện màu được cho phép xảy ra trong khi đôi khi khuấy hỗn hợp phản ứng và ngừng phản ứng hiện màu bằng cách bổ sung 1M HCl ở 25µl/giếng. Sau đó, xác định hấp thụ ở 490nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa (ARVO, được sản xuất bởi Perkin Elmer, Inc.). Để chọn lọc tế bào lai mà tạo ra kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với DR5 được biểu hiện trên màng tế bào, tế bào lai mà tạo ra dịch nổi nuôi cấy thể hiện hấp thụ cao hơn trong tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với vector biểu hiện pcDNA3.1-DR5M như được so với tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với pcDNA3.1-mô phỏng (đối chứng) được chọn là dương tính để tạo ra kháng thể kháng DR5.

1)-5 Sàng lọc kháng thể bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy

1)-5-1 Tạo ra tế bào biểu hiện gen kháng nguyên

Các tế bào 293T được tạo hạt ở 5×10^4 tế bào/cm² trong bình thót cổ 225-cm² (được sản xuất bởi Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), và nuôi cấy qua đêm trong môi trường DMEM chứa 10% FBS trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, tế bào 293T được chuyển nhiễm với pcDNA3.1-DR5M hoặc pcDNA3.1-mô phỏng có tác dụng làm đối chứng bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000, và nuôi cấy tiếp qua đêm trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, tế bào 293T được chuyển nhiễm với vector biểu hiện được xử lý bằng TrypLE Express (được sản xuất bởi Life Technologies Japan Ltd.). Sau đó, rửa tế bào bằng DMEM chứa 10% FBS, và sau đó được tạo huyền phù trong PBS chứa 5% FBS. Huyền phù tế bào thu được theo cách này được sử dụng trong phân tích đếm tế bào dòng chảy.

1)-5-2 Phân tích đếm tế bào dòng chảy

Huyền phù tế bào 293T được tạo ra trong 1)-5-1 được ly tâm và tách dịch nổi. Sau đó, dịch nổi nuôi cấy tế bào lai được bổ sung vào mỗi trong số tế bào 293T được chuyển nhiễm với pcDNA3.1-DR5M và tế bào 293T được chuyển nhiễm với pcDNA3.1-mô phỏng để tạo huyền phù tế bào và tế bào được để đứng yên ở 4°C

trong 1 giờ. Sau đó, rửa tế bào hai lần bằng PBS chứa 5% FBS, phần IgG dê được tiếp hợp fluorescein kháng IgG chuột (toàn bộ phân tử) (được sản xuất bởi Cappel Co., Ltd., #55493) được pha loãng 1000 lần bằng PBS chứa 5% FBS được bổ sung vào để tạo huyền phù tế bào và tế bào được để cho đứng yên ở 4°C trong 1 giờ. Sau khi rửa tế bào 3 lần bằng PBS chứa 5% FBS, tạo huyền phù lại tế bào trong PBS chứa 5% FBS được bổ sung với 2µg/ml 7-aminoactinomycin D (được sản xuất bởi Invitrogen (Molecular Probes) Corporation), và việc phát hiện được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào dòng chảy (FC500, Beckman Coulter, Inc.). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng Flowjo (Tree Star, Inc.). Tế bào chết dương tính 7-Aminoactinomycin D được loại trừ bằng cách sử dụng cửa. Sau đó, biểu đồ cường độ huỳnh quang FITC của tế bào có khả năng sống được tạo ra. Tế bào lai mà tạo ra mẫu mà tạo ra cường độ huỳnh quang trong biểu đồ cường độ huỳnh quang của tế bào 293T được chuyển nhiễm với pcDNA3.1-DR5M cao hơn trong biểu đồ cường độ huỳnh quang của tế bào 293T được chuyển nhiễm với pcDNA3.1-mô phỏng có tác dụng làm đối chứng được chọn là dương tính để tạo ra kháng thể kháng DR5.

1)-6 Sàng lọc tác dụng diệt tế bào

Bằng cách sử dụng dịch nổi nuôi cấy tế bào lai được chọn để tạo ra kháng thể kháng DR5 trong điểm 1)-4 và 1)-5, tác dụng gây chết tế bào đối với dòng tế bào Jurkat khối u bạch huyết T được xác nhận. IgG Fc dê kháng chuột AffiniPure đặc hiệu (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., #115-005-071) được tạo ra ở 50µg/ml với 5mM Tris-HCl (độ pH = 8,5) được phân tán ở 25µL/giếng trong nửa diện tích vi đĩa 96 giếng (được sản xuất bởi Corning Incorporated), và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa mỗi giếng hai lần bằng PBS, bổ sung dịch nổi nuôi cấy tế bào lai vào mỗi giếng và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa mỗi giếng hai lần bằng PBS, tế bào Jurkat được tạo ra ở $4,0 \times 10^4$ tế bào/ml trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS được bổ sung vào ở 25µl/well và nuôi cấy trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 20 giờ. Tác dụng

gây chết tế bào của kháng thể đơn dòng kháng DR5 có mặt trong dịch nổi nuôi cấy tế bào lai được đánh giá bằng cách xác định định lượng ATP có nguồn gốc từ tế bào có thể sống được bằng cách sử dụng kit thử nghiệm khả năng sống của tế bào huỳnh quang CellTiter-Glo (được sản xuất bởi Promega Corporation, #G7571). Kết quả là, tế bào lai mà tạo ra 5 loại kháng thể đơn dòng (B086, B139, B192, B273, và B467), mỗi trong số này thể hiện giảm lượng ATP đến 80% hoặc lớn hơn như được so với trường hợp bổ sung môi trường để nuôi cấy tế bào lai, được thiết lập.

1)-7 Xác định isotyp của kháng thể đơn dòng

Các isotyp của kháng thể đơn dòng được xác định bằng cách sử dụng kit tạo isotyp đơn dòng của chuột (được sản xuất bởi AbD Serotec, Inc.). Kết quả là, isotyp của B086, B139, B192, B273, và B467 được nhận biết là IgG1, chuỗi κ .

1)-8 Tạo ra kháng thể đơn dòng

Kháng thể đơn dòng được tinh chế từ dịch cổ trướng của chuột được ghép tế bào lai (sau đây, được gọi là “nguyên liệu khởi đầu để tinh chế kháng thể”).

Dịch cổ trướng của chuột được tạo ra như sau. Thứ nhất, chuột BALB/cAJcl-nu/nu (Japan SLC, Inc.) từ 7 đến 8 tuần tuổi được xử lý với pristan (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.), và sau khoảng 3 tuần, tế bào lai được rửa bằng nước muối sinh lý được cấy ghép vào khoang bụng ở 1×10^7 tế bào/chuột. Sau từ 1 đến 2 tuần, gom dịch cổ trướng được làm giàu trong khoang bụng và làm tiệt trùng qua dụng cụ lọc mắt lưới 0,22- μ m và nguyên liệu thu được được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để tinh chế kháng thể.

Kháng thể được tinh chế bằng Hitrap MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.). Tức là, nguyên liệu khởi đầu để tinh chế kháng thể được bổ sung vào cột và rửa cột bằng PBS, và sau đó tiến hành tách rửa bằng 2M Arginine-HCl độ pH = 4,0. Sau khi làm trung hòa dung dịch kháng thể được tách rửa, thay thế chất đệm bằng PBS. Nồng độ kháng thể thu được bằng cách tách rửa kháng thể được gắn kết với POROS G 20 μ m Column PEEK, 4,6mm $\times$

50mm, 0,83ml (Applied Biosystems, Inc.) và xác định khả năng hấp thụ (O.D. 280nm) của phần tách rửa. Cụ thể là, mẫu kháng thể được pha loãng với PBS được bổ sung vào POROS G 20 μ m được làm cân bằng với chất đệm làm cân bằng (30,6mM natri dihydro phosphat dodecahydrat, 19,5mM monokali phosphat, 0,15M NaCl, độ pH = 7,0). Sau đó, rửa cột bằng chất đệm làm cân bằng chất đệm làm cân bằng và kháng thể được gắn kết với cột sau đó được tách rửa bằng chất tách rửa (0,1% (thể tích) HCl, 0,15M NaCl). Diện tích đỉnh hấp thụ (O.D. 280 nm) của chất tách rửa được xác định và tính toán nồng độ theo phương trình sau đây: Nồng độ mẫu kháng thể (mg/ml) = (Diện tích đỉnh của mẫu kháng thể) / (Diện tích đỉnh của tiêu chuẩn tham chiếu (IgG1 của người)) $\times$ Nồng độ tiêu chuẩn tham chiếu (mg/ml) $\times$ Yếu tố pha loãng mẫu. Hơn nữa, nồng độ nội độc tố được chứa trong kháng thể thu được được xác định bằng cách sử dụng Limulus ES-II Single Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 295-51030 containing control standard endotoxin) và thiết bị xác định độc tố (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., ET-301 or ET-5000) và được xác định là 1EU/mg hoặc nhỏ hơn. Kháng thể thu được được sử dụng trong thử nghiệm tiếp theo.

1)-9 Hoạt tính diệt tế bào In vitro của kháng thể B273 chuột kháng dòng tế bào ung thư của người

Mỗi dòng tế bào u bạch huyết T của người Jurkat và dòng tế bào u nguyên bào đệm của người U-87MG được tạo ra ở $4,4 \times 10^4$ tế bào/ml trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS hoặc môi trường MEM (Minimum Essential Medium) chứa 10% FBS và được bổ sung vào vi đĩa 96 giếng đáy sạch màu trắng (được sản xuất bởi Corning Incorporated) ở 45 μ l/giếng và nuôi cấy qua đêm trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Kháng thể B273 chuột hoặc kháng thể IgG1 chuột (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) được trộn với cùng nồng độ của IgG dê kháng chuột AffiniPure đặc hiệu (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., #115-005-071), và hỗn hợp thu được được bổ sung vào ở 5 μ l/giếng sao cho nồng độ

cuối cùng của kháng thể B273 chuột hoặc kháng thể IgG1 chuột nằm trong khoảng từ 10.000 đến 0,01ng/ml, và tế bào được nuôi cấy trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 24 giờ. Lượng ATP có nguồn gốc từ tế bào có thể sống sót trong mỗi giếng được xác định bằng phát hiện quang (được sản xuất bởi Perkin Elmer, Inc.) bằng cách sử dụng kit thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (được sản xuất bởi Promega Corporation, #G7571) theo quy trình kèm theo đây. Hoạt tính gây chết tế bào được đánh giá bằng cách lấy giá trị từ giếng mà môi trường được bổ sung vào để thay thế cho dung dịch kháng thể là 100% (Fig.1). Trong mỗi đồ thị, khả năng sống của tế bào được biểu hiện là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn tiêu chuẩn ($n = 3$). Kết quả là, đã phát hiện ra rằng kháng thể B273 chuột thể hiện tác dụng gây chết tế bào đối với cả hai dòng tế bào theo cách phụ thuộc nồng độ kháng thể.

Ví dụ 2: Tạo dòng vô tính gen B273 kháng thể chuột và tạo ra gen kháng thể khảm của người

2)-1 Tạo dòng vô tính ADN bổ trợ kháng thể B273 chuột và xác định trình tự

2)-1-1 Xác định các trình tự axit amin tận cùng N của các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể B273 chuột

Để xác định các trình tự axit amin tận cùng N của các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể B273 chuột, kháng thể B273 chuột được tinh chế trong ví dụ 1-8 được tách bằng SDS-PAGE. Protein trong gel được chuyển thành gel, sau khi tách, vào màng PVDF (kích cỡ lỗ: 0,45 μ m, được sản xuất bởi Invitrogen Corporation). Rửa màng bằng chất đệm rửa (25mM NaCl, 10mM chất đệm natri borat độ pH = 8,0), và sau đó nhuộm bằng cách ngâm trong dung dịch thuốc nhuộm (50% metanol, 20% axit axetic, 0,05% xanh rõ rệt Coomassie) trong 5 phút, tiếp theo bằng cách làm mất màu bằng 90% metanol. Các phần của dải tương ứng với chuỗi nặng (dải có tính biến đổi nhỏ hơn) và dải tương ứng với chuỗi nhẹ (dải có tính biến đổi lớn hơn) quan sát được trên màng PVDF được cắt và được cho vào xác định trình tự axit amin tận

cùng N tương ứng của chúng bằng phương pháp Edman tự động (xem Edman et al. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80) bằng cách sử dụng Procise (nhãn hiệu hàng hóa đã được đăng ký) cLC Protein Sequencer Model 492cLC (Applied Biosystems, Inc.). Kết quả là, trình tự axit amin tận cùng N của dải tương ứng với chuỗi nặng của kháng thể B273 chuột là EVQLQQSGPELVKPG (SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự), và trình tự axit amin tận cùng N của dải tương ứng với chuỗi nhẹ của kháng thể B273 chuột là DVVMTQTPLSLPVSLGDQAS (SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự).

2)-1-2 Tạo ra ARN thông tin từ tế bào lai tạo ra kháng thể B273 chuột

Để tạo dòng vô tính ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể B273 chuột, tương ứng, ARN thông tin được tạo thành từ tế bào lai tạo ra kháng thể B273 bằng cách sử dụng kit tinh chế ARN thông tin Quick Prep (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.).

2)-1-3 Tạo dòng vô tính ADN bổ trợ kháng thể B273 chuột và xác định trình tự

Tham chiếu đến các phát hiện rằng các isotyp của các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể B273 chuột là $\gamma 1$ và κ được tìm thấy trong ví dụ 1-7, và trình tự axit amin tận cùng N của các chuỗi nặng và nhẹ được xác định trong 2)-1-1 trên đây, và cơ sở dữ liệu của các trình tự axit amin của các kháng thể được tạo bởi Kabat et al. (xem Kabat, E. A. et al., (1991) trong Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. I và II, U.S. Department of Health and Human Services), vài đoạn mỗi oligonucleotit lai với vùng tận cùng 5' của vùng mã hóa gen kháng thể và vùng tận cùng 3' của nó chứa codon ngừng, tương ứng, được tổng hợp và ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng và ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng cách sử dụng ARN thông tin được tạo ra ở 2)-1-2 và TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (TaKaRa Bio, Inc.). Kết quả là, ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể và ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được khuếch đại bằng bộ đoạn mỗi sau đây.

Bộ đoạn mỗi đối với chuỗi nặng

5'-aagaattcatgggatggagctgtatc-3' (MH258E1F1: SEQ ID NO: 3 trong Danh mục trình tự)

5'-aagatatcttatttaccaggagagtgaggagag-3' (G1EVR1: SEQ ID NO: 4 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn môi đối với chuỗi nhẹ

5'-aagaattcatgaagttgcctgttagg-3' (MK19EIF1: SEQ ID NO: 5 trong Danh mục trình tự)

5'-aagatatcttaacactcattcctgttgaagct-3' (KEVR1: SEQ ID NO: 6 trong Danh mục trình tự)

Mỗi ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng và ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng PCR được tạo dòng vô tính bằng cách sử dụng Kit biểu hiện pEF6/V5-His TOPO TA (Invitrogen Corporation) và mỗi trong số các trình tự nucleotit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tạo dòng vô tính được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phân tích trình tự gen ("ABI PRISM 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems" hoặc "Applied Biosystems 3730xl Analyzer; Applied Biosystems"). Trong phản ứng tạo trình tự, GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Inc.) được sử dụng.

Trình tự nucleotit được xác định của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể B273 chuột được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7 trong Danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8. Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể B273 chuột được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9 trong Danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10 trong Danh mục trình tự. Trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8 được thể hiện trong Fig.28, và trình tự của các SEQ ID NO: 9 và 10 được thể hiện trong Fig.29.

Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được phân tích bằng cách so sánh bằng cách sử dụng KabatMan (xem PROTEINS: Structure,

Function and Genetics, 25 (1996), 130-133), mà là cơ sở dữ liệu của trình tự axit amin của các kháng thể. Kết quả là, đã phát hiện ra rằng trong chuỗi nặng của kháng thể B273 chuột, trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 8 trong Danh mục trình tự là vùng biến đổi. Đã phát hiện ra rằng trong chuỗi nhẹ của kháng thể B273 chuột, trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin các số từ 20 đến 133 của SEQ ID NO: 10 trong Danh mục trình tự là vùng biến đổi.

2)-2 Sản xuất vector biểu hiện kháng thể B273 khảm

2)-2-1 Sản xuất các vector biểu hiện chung pEF6KCL và pEF1FCCU

2)-2-1-1 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ khảm và được làm giống như của người pEF6KCL

Bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng plasmit pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) làm mẫu và cũng bằng cách sử dụng các đoạn môi sau đây, mảnh ADN từ ngay phía dưới của BGHpA (Sequence Position: 2174) với SmaI (Sequence Position: 2958) (mảnh ADN chứa nguồn gốc sao chép f1 và đoạn khởi đầu và nguồn gốc SV40, sau đây được gọi là “mảnh A”) là thu được.

5'-ccacgcgccctgtagcggcgccattaagc-3' (đoạn môi EFF1: SEQ ID NO: 11 trong Danh mục trình tự)

5'-aaacccgggagcttttgcaaaagcctagg-3' (đoạn môi EFsmaR: SEQ ID NO: 12 trong Danh mục trình tự)

Mảnh A và mảnh ADN thu được (SEQ ID NO: 13, sau đây được gọi là “mảnh B”) chứa trình tự ADN mã hóa tín hiệu kích thích chuỗi κ của người, vùng cố định chuỗi κ của người và tín hiệu bổ sung poly-A của người được thắt với nhau bằng PCR kéo dài gối nhau. Mảnh ADN thu được theo cách này trong đó mảnh A và mảnh B được thắt với nhau được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn KpnI và SmaI, mà được thắt với plasmit pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) mà được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn KpnI và SmaI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nhẹ khảm và

được làm giống như của người pEF6KCL có trình tự tín hiệu, vị trí tạo đơn dòng, vùng cố định chuỗi κ của người và trình tự tín hiệu bổ sung A của đoạn khởi đầu EF1 được tạo cấu trúc.

2)-2-1-2 Tạo cấu trúc pEF1/KCL

Mảnh ADN thu được bằng cách tách pEF6KCL thu được bằng phương pháp được mô tả trên đây với các enzym giới hạn KpnI và SmaI được thất thành pEF1/myc-HisB (Invitrogen Corporation) mà được tiêu hóa bằng KpnI và SmaI, nhờ đó plasmit pEF1KCL được tạo cấu trúc.

2)-2-1-3 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng khảm và được làm giống như của người pEF1FCCU

Mảnh ADN (SEQ ID NO: 14) chứa trình tự ADN mã hóa các axit amin của trình tự tín hiệu và vùng cố định của IgG1 của người được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI và được thất thành plasmit pEF1KCL mà được tiêu hóa bằng NheI và PmeI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nặng khảm và được làm giống như của người pEF1FCCU có trình tự tín hiệu, vị trí tạo dòng vô tính, vùng cố định chuỗi nặng của người và trình tự tín hiệu bổ sung poly-A của người của đoạn khởi đầu EF1 được tạo cấu trúc.

2)-2-2 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu khảm B273

Bằng cách sử dụng ADN mã hóa chuỗi nhẹ kháng thể B273 chuột làm mẫu và cũng sử dụng KOD-Plus-(TOYOBO, Co., Ltd.) và bộ đoạn mồi sau đây, vùng chứa ADN bổ trợ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại. Mảnh ADN thu được bằng cách tách sản phẩm được khuếch đại bằng các enzym giới hạn NdeI và BsiWI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm giống như của người chung (pEF6KCL) ở vị trí được tách bởi các enzym giới hạn NdeI và BsiWI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu khảm B273 được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF6KCL/B273L”. Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu khảm B273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15 trong Danh mục

trình tự, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16. Các trình tự SEQ ID NO: 15 và 16 được thể hiện trong Fig.30. Một cách ngẫu nhiên, gốc axit amin ở vị trí 134 trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu khảm được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16 trong Danh mục trình tự được định vị ở tận cùng carboxyl của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và tương ứng với gốc alanin ở vị trí 133 trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể B273 chuột được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10 trong Danh mục trình tự, tuy nhiên, trong trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16, gốc đã được thay thế bằng gốc threonin có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ kháng thể người. Bộ đoạn môi đối với chuỗi nhẹ:

5'-aaacatatggc gatgttgatgacccaaactccactctcc-3' (B273LF: SEQ ID NO: 17 trong Danh mục trình tự)

5'-aaacgtacgtttgattccagcttggtgcctccaccgaacg-3' (B273LR: SEQ ID NO: 18 trong Danh mục trình tự)

2)-2-3 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu khảm B273

Bằng cách sử dụng ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể B273 chuột làm mẫu và cũng bằng cách sử dụng KOD-Plus-(TOYOBO, Co., Ltd.) và bộ đoạn môi sau đây, vùng chứa ADN bổ trợ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng được khuếch đại. Mảnh ADN thu được bằng cách tách sản phẩm được khuếch đại với enzym giới hạn BlnI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nặng kháng thể khảm và được làm giống như của người chung (pEF1FCCU) ở vị trí được tách bởi enzym giới hạn BlnI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu khảm B273 được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF1FCCU/B273H”. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu khảm B273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 19 trong Danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20. Các trình tự SEQ ID NO: 19 và 20 được thể hiện trong Fig.31.

Bộ đoạn môi đối với chuỗi nặng:

5'-aaagctgagcgagggttcagctgcagcagctctggacctgagc-3' (B273HF: SEQ ID NO: 21 trong

Danh mục trình tự)

5'-aaagctgagctgactgtgagagtgggtgccttgccccagtag-3' (B273HR: SEQ ID NO: 22 trong Danh mục trình tự)

2)-3 Sản xuất kháng thể B273 khảm

2)-3-1 Sản xuất kháng thể B273 khảm

$1,2 \times 10^9$ tế bào của tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) trong giai đoạn phát triển loga được tạo hạt thành 1,2L môi trường biểu hiện FreeStyle 293 sạch (Invitrogen Corporation) và được nuôi cấy trong 1 giờ bằng cách lắc ở 90 vòng/phút ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. 3,6mg polyetylenimin (Polyscience #24765) được hòa tan trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Sau đó, pEF1FCCU/B273H (0,4mg) và pEF6KCL/B273L (0,8mg) được tạo thành với Kit plasmit PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) được tạo huyền phù trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM. Sau đó, 20ml chất lỏng hỗn hợp vector biểu hiện/Opti-Pro SFM thu được được bổ sung vào 20ml chất lỏng hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM thu được và khuấy nhẹ hỗn hợp thu được và sau đó để trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào FreeStyle 293F đang lắc ở 90 vòng/phút được thực hiện trong 7 ngày ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. Lọc dịch nổi nuôi cấy thu được qua dụng cụ lọc nang dùng một lần (Advantec #CCS-045-E1H).

Kháng thể B273 khảm thu được bằng cách kết hợp pEF1FCCU/B273H và pEF6KCL/B273L được gọi là “cB273”.

2)-3-2 Tinh chế cB273

Dịch nổi nuôi cấy thu được trong 2)-3-1 trên đây được tinh chế bằng quy trình hai bước bao gồm sắc ký ái lực rProtein A (ở từ 4 đến 6°C) và hydroxyapatit gồm (ở nhiệt độ trong phòng). Bước thay thế chất đệm sau khi tinh chế bằng cách sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Thứ nhất, từ 1100 đến 1200ml dịch nổi nuôi cấy được áp

dụng vào MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột HiTrap (thể tích: 1 ml) được nối theo dây) được làm cân bằng với PBS. Sau đó, rót tất cả dung dịch nuôi cấy vào cột, rửa cột bằng từ 15 đến 30ml PBS. Sau đó, tiến hành tách rửa bằng 2M dung dịch arginin hydroclorua (độ pH = 4,0) và gom phần chứa kháng thể. Áp dụng phần này vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5ml) được nối theo dây), nhờ đó chất đệm được thay thế bằng chất đệm chứa 5mM natri phosphat, 50mM MES, và 20mM NaCl ở độ pH = 6,5. Hơn nữa, dung dịch kháng thể này được cho vào thay thế chất đệm được áp dụng vào cột hydroxyapatit gồm (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., cột Bio-Scale CHT2-1 hydroxyapatit (thể tích: 2ml)) được làm cân bằng với chất đệm chứa 5mM NaPi, 50mM MES, và 20mM NaCl ở độ pH = 6,5. Sau đó, tách rửa gradient nồng độ tuyến tính với natri clorua được thực hiện và gom phần chứa kháng thể. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5ml) được nối theo dây), nhờ đó chất lỏng được thay thế bằng CBS (10mM chất đệm xitrat chứa 140mM natri clorua, độ pH = 6,0). Cuối cùng, cô đặc dung dịch thu được bằng cách sử dụng Dụng cụ lọc Centrifugal UF VIVASPIN 20 (trọng lượng phân tử phân đoạn: 30K, Sartorius Co., Ltd., ở 4°C), và nồng độ IgG được điều chỉnh đến 1,0mg/ml hoặc lớn hơn và dung dịch thu được theo cách này được sử dụng làm mẫu tinh chế.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính của kháng thể B273 khảm của người (cB273) (in vitro)

3)-1 Nghiên cứu đặc tính gắn kết chọn lọc của kháng thể cB273 với miên ngoại bào DR5 của người

Đặc tính gắn kết của cB273 với protein miên ngoại bào của TRAIL từ R1 đến R4 của người và TRAIL R2 của chuột (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) được nghiên cứu bằng phương pháp ELISA trực tiếp dưới đây. Thứ nhất, mỗi protein miên ngoại bào của các TRAIL R được pha loãng đến 1µg/ml với PBS, và phân tán

dung dịch pha loãng ở 50 μ l/giếng vào đĩa miễn dịch (được sản xuất bởi Nunc, Inc., #442404), và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C, nhờ đó protein được hấp thụ vào đĩa. Vào ngày tiếp theo, loại bỏ chất lỏng trong mỗi giếng và rửa mỗi giếng một lần bằng PBS. Sau đó, để ngăn chặn hấp thụ protein không đặc hiệu, phân tán PBS chứa huyết thanh bào thai bò 3% ở 200 μ l/giếng và đĩa được để đứng yên ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Loại bỏ chất lỏng trong mỗi giếng và cB273 hoặc TRAIL của người có thể hòa tan (được sản xuất bởi ALEXIS Corporation, #ALX-522-003) được pha loãng với PBS chứa huyết thanh bào thai bò 3% được bổ sung vào ở 50 μ l/giếng. Sau đó, đĩa được để đứng yên ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ, PBS được bổ sung vào mỗi giếng và sau đó, loại bỏ chất lỏng trong mỗi giếng và rửa các giếng hai lần bằng PBS. Sau đó, bổ sung kháng thể cB273 vào mỗi giếng, mảnh IgG F(ab')₂ của dê kháng người đặc hiệu, peroxidaza được tiếp hợp (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., #109-035-097) được pha loãng 2500 lần bằng PBS chứa huyết thanh bào thai bò 3% được bổ sung vào ở 50 μ l/giếng và vào giếng mà TRAIL có thể hòa tan được bổ sung vào, tiếp hợp peroxidaza kháng thể đơn dòng kháng FLAG M2 được pha loãng 2000 lần được bổ sung vào ở 50 μ l/giếng và đĩa được để đứng yên ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó, bổ sung PBS vào mỗi giếng, loại bỏ chất lỏng trong mỗi giếng, và rửa giếng hai lần bằng PBS. Sau đó, dung dịch hiện màu OPD được bổ sung vào ở 100 μ l/giếng, nhờ đó tạo màu. Sau đó, bổ sung 1M HCl vào ở 100 μ l/giếng, nhờ đó phản ứng hiện màu được ngừng lại. Sau đó, xác định khả năng hấp thụ ở 492nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa. Fig.2A thể hiện các kết quả đối với cB273, và Fig.2B thể hiện các kết quả đối với TRAIL có thể hòa tan. Dữ liệu trong đồ thị được biểu hiện theo giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (n = 3). Kết quả là, đã thể hiện rằng cB273 gắn kết chọn lọc với miền ngoại bào của TRAIL R2 của người.

3)-2 Đánh giá hoạt tính gắn kết của kháng thể cB273 bằng cách sử dụng Biacore

3)-2-1 Sản xuất protein miền ngoại bào DR5 của người

3)-2-1-1 Sản xuất vector biểu hiện miền ngoại bào DR5

Để tạo cấu trúc vector mà biểu hiện vùng (sau đây được gọi là “sDR5”) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin các số từ 1 đến 130 của DR5 người được thể hiện bởi SEQ ID NO: 23 trong Danh mục trình tự, phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ đoạn môi để khuếch đại sDR5:

DR5 Ndefw: 5’-gtggcatatggctctgatcacccaacaa-3’ (SEQ ID NO: 24 trong Danh mục trình tự) và

DR5 Xhorv: 5’-cgctcgagtgattctttgtggacaca-3’ (SEQ ID NO: 25 trong Danh mục trình tự) và cũng bằng cách sử dụng ADN bổ trợ mã hóa miền ngoại bào DR5 của người làm mẫu. Sản phẩm PCR thu được được tách bằng NdeI và XhoI và được tạo dòng vô tính vào vị trí NdeI/XhoI của pET21b(+) (được sản xuất bởi Novagen, Inc.) (sau đây được gọi tắt là “pET21b(+)-sDR5”). Hơn nữa, protein tái tổ hợp được biểu hiện bởi “pET21b(+)-sDR5” được gọi là “rsDR5” (SEQ ID NO: 26 trong Danh mục trình tự) sau đây và trong các hình vẽ.

3)-2-1-2 Sản xuất protein miền ngoại bào DR5 (rsDR5)

Escherichia coli Origami B (DE3) (được sản xuất bởi Novagen, Inc.) được biến nạp với plasmid biểu hiện pET21b(+)-sDR5 và được nuôi cấy trong môi trường 2-YT được bổ sung với 100µg/ml ampicillin (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.) và 15µg/ml kanamycin (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), và biểu hiện protein riêng phần của DR5 được cảm biến bằng cách bổ sung 0,5mM IPTG. Gom tế bào bằng cách ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 20 phút và được tạo huyền phù trong chất đệm gắn kết (50mM Tris-HCl độ pH = 7,5, 300mM NaCl), tiếp theo bằng cách tạo đồng nhất bằng siêu âm trên đá lạnh. Ly tâm chất đồng nhất thu được ở 25000 vòng/phút trong 20 phút. Thu gom dịch nổi và áp dụng vào Ni-NTA (được sản xuất bởi Invitrogen Corporation). Sau đó, tiến hành rửa bằng chất đệm gắn kết, tiến hành tách rửa bằng chất đệm tách rửa (50mM Tris-HCl độ pH = 7,5, 300mM NaCl và 300 mM imidazol). Thẩm tách mẫu được tách rửa bằng chất đệm

thẩm tách (50mM Tris-HCl độ pH = 8,0, 20mM NaCl) và áp dụng vào MONO Q, và tách rửa gradient được thực hiện bằng cách chất đệm tách rửa (50mM Tris-HCl độ pH = 8,0, 1M NaCl). Tinh chế tiếp mẫu được tách rửa bằng cách sắc ký cột lọc gel (Superdex 75 16/60, được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) bằng cách sử dụng PBS làm dung môi. Nồng độ của protein tái tổ hợp thu được theo cách này được xác định ở UV 280nm (bằng số hấp thụ phân tử: 14855).

3)-2-2 Xác định hoạt tính gắn kết bằng cách sử dụng Biacore

Hằng số phân ly của mỗi kháng thể cB273 và rsDR5 được xác định bằng cách sử dụng Biacore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) bằng phương pháp bắt giữ trong đó kháng thể được bắt giữ bởi kháng thể kháng IgG (Fc) người được làm cố định và tiến hành xác định bằng cách sử dụng kháng nguyên làm chất phân tích. Kháng thể kháng IgG (Fc) người (Kháng thể người Capture Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) được làm cố định cùng hóa trị trên chip cảm biến CM5 (BIAcore, Inc.) ở khoảng 8000 RU bằng phương pháp cặp đôi amin. Việc làm cố định được thực hiện cũng trên tế bào tham chiếu theo cách tương tự. Đối với chất đệm chạy, HBS-EP (10 mM HEPES độ pH = 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% chất có hoạt tính bề mặt P20) được sử dụng. Đối với chip có kháng thể kháng IgG (Fc) người được cố định trên đó, 50nM dung dịch kháng thể cB273 được bổ sung vào ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 60 giây và sau đó, các loạt pha loãng của rsDR5 (0,63-20nM) được bổ sung vào ở tốc độ dòng 30 μ l/phút trong 60 giây và sau đó, kiểm soát pha phân ly trong 300 giây. Đối với dung dịch sinh ra, 3M magie clorua được bổ sung vào ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 30 giây. Trong phân tích dữ liệu, phần mềm phân tích (BIAevaluation software, version 3.1) được sử dụng với mô hình gắn kết lần lượt và hằng số kết hợp (kon), hằng số phân ly (koff), và hằng số phân ly (KD; KD = koff/kon) được tính toán. Các kết quả thu được bằng cách xác định bằng cách sử dụng Biacore đối với kháng thể cB273 được thể hiện trong Fig.3.

3)-3 Tác dụng gây chết tế bào In vitro của kháng thể cB273 đối với các dòng tế bào

ung thư của người

Tác dụng gây chết tế bào của kháng thể cB273 đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau được nghiên cứu bằng phương pháp sau đây. A2780, SK-OV-3, SK-CO-1, Caov-3, và NIH:OVCAR-5 (tất cả trong số chúng là các dòng tế bào ung thư buồng trứng của người), HCT-15, COLO 205, HT29, SW480, SW620, DLD-1, COLO 201, và WiDr (tất cả trong số chúng là dòng tế bào ung thư ruột kết của người), NCI-H1975, NCI-H292, NCI-H460, và NCI-H358 (tất cả trong số chúng là dòng tế bào ung thư phổi của người), MDA-MB-231 và ZR-75-1 (cả hai cùng là dòng tế bào ung thư vú của người) được mua của American Type Culture Collection (ATCC). Mỗi trong số các dòng tế bào này được tạo thành ở 1×10^5 tế bào/ml với môi trường chứa huyết thanh bào thai bò 10% (được sản xuất bởi HyClone Laboratories, Inc.) (sau đây được gọi là “môi trường”) và tạo hạt ở 50 μ l/giếng trong vi đĩa 96 giếng đáy sạch màu trắng (được sản xuất bởi Corning Incorporated). Kháng thể cB273 được tạo ra ở 20000ng/ml với dung dịch 1 μ g/ml kháng thể thứ cấp (IgG Fc dê kháng người, được sản xuất bởi MP Biomedicals, LLC.), và sau đó được tạo ra ở 2000, 200, 20, và 2 ng/ml với môi trường và mỗi dung dịch thu được được bổ sung vào đĩa ở 50 μ l/giếng (nồng độ cuối cùng của kháng thể: 10000, 1000, 100, 10, và 1 ng/ml). Sau đó, ủ đĩa trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 72 giờ, lượng ATP có nguồn gốc từ tế bào có khả năng sống sót trong mỗi giếng được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm khả năng sống của tế bào huỳnh quang CellTiter-Glo (được sản xuất bởi Promega Corporation, #G7571) bằng phát hiện quang (được sản xuất bởi Berthold Technologies) theo quy trình kèm theo. Giếng mà môi trường và huyền phù tế bào được bổ sung được tạo ra là giếng đối chứng âm tính và giếng mà chỉ có môi trường được bổ sung vào được tạo ra là giếng cơ bản và khả năng sống của tế bào trong mỗi giếng được tính toán. Trong Fig.4, giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn (n = 3) của khả năng sống của tế bào đối với mỗi dòng tế bào ung thư được xử lý bằng kháng thể cB273 được thể hiện. Kháng thể cB273 thể hiện hoạt tính

gây chết tế bào kháng dòng tế bào ngoại trừ đối với SK-CO-1.

Tác dụng gây chết tế bào in vitro đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau được nghiên cứu bằng cách sử dụng BxPC-3 và MIA PaCa-2 (cả hai cùng là các dòng tế bào ung thư tuyến tụy của người), A2058 và A375 (cả hai cùng là dòng tế bào khối u ác tính của người), U-87MG (dòng tế bào u nguyên bào đệm của người), AN3CA (dòng tế bào ung thư màng trong dạ con của người) là đối tượng thử nghiệm. Mỗi trong số các dòng tế bào này được tạo thành ở $4,4 \times 10^4$ tế bào/ml với môi trường chứa 10% FBS và được bổ sung ở 45µl/giếng trong vi đĩa 96 giếng đáy sạch màu trắng (được sản xuất bởi Corning Incorporated), và ủ đĩa qua đêm trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Kháng thể cB273 được trộn với cùng nồng độ IgG Fc dê kháng người (được sản xuất bởi MP Biomedicals, LLC.), và sau đó bổ sung hỗn hợp thu được vào đĩa 5µl/giếng sao cho nồng độ cuối cùng của kháng thể cB273 nằm trong khoảng từ 10.000 đến 1ng/ml và ủ đĩa trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 24 giờ. Lượng ATP có nguồn gốc từ tế bào có khả năng sống trong mỗi giếng được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm khả năng sống của tế bào huỳnh quang CellTiter-Glo (được sản xuất bởi Promega Corporation, #G7571) bằng phát hiện quang (được sản xuất bởi Perkin Elmer Inc.) theo quy trình kèm theo. Mỗi đồ thị thể hiện khả năng sống của tế bào được biểu hiện theo giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (n = 3). Kết quả là, kháng thể cB273 thể hiện tác dụng gây chết tế bào đối với tất cả dòng tế bào ung thư được nghiên cứu (Fig.5).

Ví dụ 4: Nhận biết epitop của kháng thể cB273y

4)-1 Sản xuất mảnh cB273 Fab

cB273 được thẩm tách với PBS, và sau đó pha loãng thành 2mg/ml với PBS và tạo ra thể tích cuối cùng 17ml. Xystein (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.) được tạo ra ở 0,1mM trong PBS với lượng 1,7ml và papain (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.) được pha loãng thành 0,1mg/ml với PBS với lượng 2,04ml được bổ sung vào và phản ứng được cho phép xảy ra ở 37°C trong 5 giờ. Sau 5 giờ, N-ethylmaleimide

(được sản xuất bởi Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) được hòa tan ở 120mM trong PBS với lượng 6,33ml được bổ sung vào để làm ngừng phản ứng. Dung dịch phản ứng được bổ sung vào Superdex 200 26/60 (được sản xuất bởi GE Healthcare, Co., Ltd.) được làm cân bằng với 50mM Tris-HCl chứa 20mM NaCl, và 14ml phản tương ứng với mảnh Fab được gom lại.

4)-2 Sản xuất mẫu phức hợp mảnh cB273 Fab-rsDR5

Mảnh cB273 Fab được cô đặc đến 9,46mg/ml bằng cách sử dụng Amicon Ultra-15 (MWCO: 10 K) (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.), và 2ml mảnh cB273 Fab được cô đặc theo cách này được trộn với 2ml rsDR5 được cô đặc đến 5,6mg/ml bằng cách sử dụng Amicon Ultra-15 (MWCO: 3 K), và hỗn hợp thu được được bổ sung vào Superdex 200 16/60 được làm cân bằng với 20mM Tris-HCl chứa 50mM NaCl. 8ml phản tương ứng với phức hợp này được gom lại.

4)-3 Kết tinh và phân tích cấu trúc của phức hợp mảnh cB273 Fab-rsDR5

Cô đặc phức hợp rsDR5-cB273 Fab thu được theo cách này thành 25mg/ml, mà được sử dụng để kết tinh. Để kết tinh, phương pháp khuếch tán dạng hơi được sử dụng. Dung dịch thu được bằng cách bổ sung lượng cân bằng của dung dịch chứa chất làm kết tủa (từ 6 đến 8% (trọng lượng/thể tích) polyetylen glycol 4000, 20% (thể tích) isopropanol, 0,1M lithi clorua, 0,1M chất đệm xitrat (độ pH = 5,6)) đến 0,45 đến 1,0 μ l dung dịch protein được đặt vào vật chứa kín khí, trong đó 0,45ml dung dịch chứa chất làm kết tủa đã được đặc vào, sao cho cả hai dung dịch không tiếp xúc với nhau và vật chứa được để đứng yên ở 22°C. Sau 3 ngày, thu được tinh thể hình đĩa (0,4mm x 0,3mm x 0,03mm).

Ngâm tinh thể thu được theo cách này vào dung dịch chứa chất làm kết tủa được bổ sung 30% (thể tích) glycerol, và sau đó được làm đông lạnh trong dòng nitơ ở -180°C. Thu thập dữ liệu nhiễu xạ tia X trong dòng nitơ ở 95K trên BL17A ở the Photon Factory of the Institute of Materials Structure Science in the High Energy Accelerator Research Organization. Từ hình ảnh nhiễu xạ thu được, cường độ nhiễu

xạ được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm HKL-2000 (được sản xuất bởi HKL Research, Inc.), và tính toán các yếu tố cấu trúc tinh thể. Tinh thể thu được thuộc về hệ đơn nghiêng, nhóm không gian là C2 và tinh thể có các tham biến ngắn đơn vị: $a = 152,0 \text{ \AA}$, $b = 75,5 \text{ \AA}$, $c = 116,3 \text{ \AA}$ và $\beta = 110,2$.

Phương pháp thay thế phân tử được thực hiện bằng cách sử dụng các yếu tố cấu trúc thu được theo cách này và các kết hợp cấu trúc ba chiều của DR5 (mã số PDB: 2H9G) và Herceptin Fab (mã số PDB: 1N8Z), và xác định các pha. Theo tính toán, pha phần mềm (CCP4: Collaborative Computational Project No. 4) được sử dụng. Tinh thể chứa hai phức hợp theo đơn vị không đối xứng.

Cấu trúc được tinh chế bằng cách sử dụng phần mềm CNX (Accelrys Inc.), và mô hình được hiệu chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm Coot. Quy trình này được lặp lại và giá trị R cuối cùng 25,0% và giá trị R tự do 28,7% thu được ở phân giải 2,1 Å. Mô hình cuối cùng bao gồm hai phức hợp và chứa các gốc axit amin từ 1 đến 218 của chuỗi cB273 Fab L (cả hai phân tử), các gốc axit amin từ 1 đến 222 của chuỗi H (cả hai phân tử), các gốc axit amin từ 18 đến 92 và từ 98 đến 127 của một phân tử DR5 trong số hai phân tử, các gốc axit amin từ 21 đến 92 và từ 98 đến 127 của phân tử còn lại của DR5 và 324 phân tử nước. Không quan sát thấy mật độ điện tử rõ ràng đối với các gốc axit amin từ 93 đến 97 của DR5, 17 hoặc 20 gốc trong tận cùng N của DR5, 6 gốc và His tag ở tận cùng C của DR5, một gốc ở tận cùng C của chuỗi cB273 Fab L và 5 gốc ở tận cùng C của chuỗi cB273 Fab H và do đó, mô hình không được tạo cấu trúc. Mô hình được phê chuẩn bởi Ramachandran plot, và đã phát hiện ra rằng chỉ Val 56 của chuỗi L được đặt bên ngoài vùng cho phép và Val 56 axit amin này có đặc điểm cấu trúc của CDR L2.

Các tương tác được xác định giữa DR5 và cB273 Fab về căn bản là bằng nhau trong hai phân tử theo đơn vị không đối xứng. Các gốc axit amin (vị trí của mỗi gốc axit amin tương ứng với vị trí của SEQ ID NO: 23) của DR5 mà nằm ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn từ cB273 Fab là như sau: Gly26, Ile34, Glu36, Asp37, Gly38,

Asp56, Leu57, Leu58, Phe59, Leu61, và Arg62. Fig.6 thể hiện mô hình ribbon của toàn bộ phức hợp và bề mặt của nó và Fig.7 thể hiện sự tương tác giữa DR5 và chuỗi H hoặc L của cB273 Fab.

Ví dụ 5: Làm giống người của kháng thể cB273 (1)

5)-1 Xác định B273 được làm giống như của người (hB273)

5)-1-1 Tạo mô hình phân tử của các vùng biến đổi B273

Tạo mô hình phân tử của các vùng biến đổi B273 được thực hiện theo phương pháp thường được biết như tạo mô hình đồng nhất (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Các trình tự sơ cấp (các cấu trúc ba chiều từ các cấu trúc tinh thể tia X là sẵn có) của các vùng biến đổi của globulin miễn dịch của người được đăng ký ở Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 28, 235-242 (2000)) được so với các vùng biến đổi B273 được xác định trên đây. Kết quả là, 1T66 được làm trình tự có tính tương đồng trình tự cao nhất với vùng biến đổi chuỗi nhẹ B273. Hơn nữa, 1XIW được chọn làm trình tự có tính tương đồng trình tự cao nhất với vùng biến đổi chuỗi nặng B273. Cấu trúc ba chiều của vùng khung được tạo ra dựa trên “mô hình khung” bằng cách kết hợp các kết hợp của 1T66 và 1XIW tương ứng với chuỗi nhẹ và chuỗi nặng B273. Đối với các B273 CDR, CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, và CDRH2 lần lượt được chuyển cho các nhóm 16A, 7A, 9A, 10A, và 10A, theo cách phân loại của Thornton et al. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)). CDRH3 được phân loại trong k(11)-theo vai trò H3 (FEBS letters 399, 1-8 (1996)). Sau đó, hình dáng đại diện của mỗi CDR được kết hợp vào mô hình khung.

Cuối cùng, để thu được mô hình phân tử có thể có của vùng biến đổi B273 theo năng lượng, sự tính toán năng lượng được thực hiện để loại trừ tiếp xúc tồn tại giữa các phân tử bất lợi. Quy trình trên đây được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình dự báo cấu trúc bậc ba của protein hiện có bán sẵn trên thị trường Prime và chương trình tra cứu kết hợp MacroModel (Schrödinger, LLC).

5)-1-2 Xác định trình tự axit amin của B273 được làm giống như của người

Kháng thể B273 được làm giống như của người được tạo cấu trúc theo phương pháp thường được biết là ghép CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Kháng thể thụ thể được chọn dựa trên tính tương đồng của axit amin trong vùng khung.

Trình tự vùng khung của B273 được so với tất cả trình tự khung của người trong Kabat Database (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) của trình tự axit amin của kháng thể. Kết quả là, kháng thể HuMc3 được chọn là chất nhận dựa trên tính tương đồng trình tự 76% trong vùng khung. Các gốc axit amin trong vùng khung của HuMc3 được sắp xếp với các gốc axit amin của B273, và các vị trí trong đó các axit amin khác nhau được sử dụng là được nhận biết. Các vị trí của các gốc này được phân tích bằng cách sử dụng mô hình kích thước ba chiều của B273 được tạo cấu trúc trên đây. Sau đó, các gốc cho trên chất nhận được chọn theo các tiêu chuẩn được đề xuất bởi Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

Bằng cách chuyển một số gốc cho được chọn vào kháng thể nhận, trình tự B273 được làm giống như của người được tạo cấu trúc như được mô tả trong ví dụ sau đây.

5)-1-2 Làm giống người chuỗi nhẹ B273

5)-1-2-1 chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1:

Chuỗi nhẹ B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 22 (valin), 27 (threonin), 34 (serin), 35 (leuxin), 37 (axit aspartic), 38 (glutamin), 70 (lysin), 108 (leuxin), 110 (isoleuxin), 112 (phenylalanin), 125 (glyxin) và 129 (leuxin) của chuỗi nhẹ cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16 trong Danh mục trình tự với isoleuxin, serin, threonin, prolin, axit glutamic, prolin, glutamin, valin, valin, tyrosin, prolin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1”.

Trình tự nucleotit mã hóa kiểu chuỗi nhẹ hB273_L1 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu

hB273_L1 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28 trong Danh mục trình tự. Các trình tự của các SEQ ID NO: 27 và 28 cũng được thể hiện trong Fig.32.

5)-1-2-2 chuỗi nhẹ kiểu hB273_L2:

Chuỗi nhẹ B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 37 (axit aspartic), 38 (glutamin), 108 (leuxin), 110 (isoleuxin), 125 (glyxin) và 129 (leuxin) của chuỗi nhẹ cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16 trong Danh mục trình tự với axit glutamic, prolin, valin, valin, prolin và valin, tương ứng với, được gọi là “chuỗi nhẹ kiểu hB273_L2”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L2 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 29 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ hB273_L2 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 30 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 29 và 30 cũng được thể hiện trong Fig.33.

5)-1-2-3 chuỗi nhẹ kiểu hB273_L3:

Chuỗi nhẹ B273 được làm giống như của người bằng cách thay thế axit amin các số 37 (axit aspartic), 38 (glutamin), 108 (leuxin), 110 (isoleuxin) và 129 (leuxin) của chuỗi nhẹ cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16 trong Danh mục trình tự với axit glutamic, prolin, valin, valin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nhẹ kiểu hB273_L3”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L3 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 31 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L3 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 32 trong Danh mục trình tự. Các trình tự của các SEQ ID NO: 31 và 32 cũng được thể hiện trong Fig.34.

5)-1-3 Làm giống người chuỗi nặng B273

5)-1-3-1 chuỗi nặng kiểu hB273_H1:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 20 (axit glutamic), 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39 (isoleuxin), 56 (methionin), 57 (lysin), 59 (serin), 60

(histidin), 62 (lysin), 63 (serin), 67 (isoleuxin), 86 (lysin), 87 (alanin), 95 (serin), 96 (threonin), 99 (histidin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 114 (phenylalanin), 116 (glyxin), 136 (threonin) và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục trình tự với glutamin, valin, alanin, valin, lysin, valin, valin, arginin, alanin, prolin, methionin, glyxin, methionin, arginin, valin, threonin, serin, tyrosin, serin, arginin, threonin, tyrosin, alanin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nặng kiểu hB273_H1”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H1 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 33 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H1 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 34 trong Danh mục trình tự. Các trình tự của các SEQ ID NO: 33 và 34 cũng được thể hiện trong Fig.35.

5)-1-3-2 chuỗi nặng kiểu hB273_H2:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 20 (axit glutamic), 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39 (isoleuxin), 60 (histidin), 62 (lysin), 95 (serin), 96 (threonin), 99 (histidin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 116 (glyxin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục trình tự với glutamin, valin, alanin, valin, lysin, valin, prolin, methionin, threonin, serin, tyrosin, serin, arginin, threonin, alanin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nặng kiểu hB273_H2”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 35 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 36 trong Danh mục trình tự. Các trình tự của các SEQ ID NO: 35 và 36 cũng được thể hiện trong Fig.36.

5)-1-3-3 chuỗi nặng kiểu hB273_H3:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39

(isoleuxin), 60 (histidin), 95 (serin), 96 (threonin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 136 (threonin) và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục trình tự với valin, alanin, valin, lysin, valin, prolin, threonin, serin, serin, arginin, threonin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nặng kiểu hB273_H3”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H3 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 37 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H3 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 38 trong Danh mục trình tự. Các trình tự của các SEQ ID NO: 37 và 38 cũng được thể hiện trong Fig.37.

5)-2 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1, hB273_L2, và hB273_L3

Các ADN chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1, hB273_L2 hoặc hB273_L3 được thể hiện bởi axit amin các số từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 28, axit amin các số từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 30 hoặc axit amin các số từ 21 đến 134 của SEQ ID NO: 32 được tổng hợp (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Sau đó, mỗi trong số các mảnh ADN thu được bằng cách tách các ADN được tổng hợp với các enzym giới hạn NdeI và BsiWI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF6KCL) ở vị trí được tách bởi các enzym giới hạn NdeI và BsiWI, nhờ đó các vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1, hB273_L2, và hB273_L3 được tạo cấu trúc. Các vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF6KCL/hB273_L1”, “pEF6KCL/hB273_L2”, và “pEF6KCL/hB273_L3”, tương ứng.

5)-3 Tạo cấu trúc vector biểu hiện hB273_H1, hB273_H2, và chuỗi nặng kiểu hB273_H3

Các ADN chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kiểu hB273_H1, hB273_H2 hoặc hB273_H3 được thể hiện bởi axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 34 trong Danh mục trình tự, axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ

ID NO: 36 hoặc axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 38 được tổng hợp (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Sau đó, mỗi trong số các mảnh ADN thu được bằng cách tách các ADN được tổng hợp bằng enzym giới hạn BlnI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF1FCCU) ở vị trí được tách bằng enzym giới hạn BlnI, nhờ đó hB273_H1, hB273_H2, và các vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu hB273_H3 được tạo cấu trúc. Các vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF1FCCU/hB273_H1”, “pEF1FCCU/hB273_H2”, và “pEF1FCCU/hB273_H3”, tương ứng.

5)-4 Sản xuất kháng thể được làm giống như của người

5)-4-1 Sản xuất kháng thể được làm giống như của người

$1,2 \times 10^9$ tế bào của tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) trong giai đoạn phát triển loga được tạo hạt thành 1,2L môi trường biểu hiện fresh FreeStyle 293 (Invitrogen Corporation) và nuôi cấy trong 1 giờ bằng cách lắc ở 90 vòng/phút ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. 3,6mg polyetylenimin (Polyscience #24765) được hòa tan trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Sau đó, vector biểu hiện chuỗi nặng (0,4mg) và vector biểu hiện chuỗi nhẹ (0,8mg) được tạo ra bằng kit plasmit PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) được tạo huyền phù trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM. Sau đó, 20ml chất lỏng hỗn hợp vector biểu hiện thu được /Opti-Pro SFM được bổ sung vào 20ml chất lỏng hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM thu được và khuấy nhẹ hỗn hợp thu được và sau đó để trong 5 phút. Sau đó, bổ sung hỗn hợp này vào tế bào FreeStyle 293F. Sau 3 giờ, Z-VAD-FMK (PEPTIDE INSTITUTE, Inc.) được bổ sung vào ở nồng độ cuối cùng 10μM, và tiến hành lắc môi trường nuôi cấy ở 90 vòng/phút trong 7 ngày ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. Lọc dịch nổi nuôi cấy thu được qua dụng cụ lọc nang dùng một lần (Advantec #CCS-045-E1H).

Kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết

hợp của pEF1FCCU/hB273_H1 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H1/hB273_L1”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H1 và pEF6KCL/hB273_L2 được gọi là “hB273_H1/hB273_L2”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H1 và pEF6KCL/hB273_L3 được gọi là “hB273_H1/hB273_L3”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H2/hB273_L1”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2 và pEF6KCL/hB273_L2 được gọi là “hB273_H2/hB273_L2”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2 và pEF6KCL/hB273_L3 được gọi là “hB273_H2/hB273_L3”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H3 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H3/hB273_L1”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H3 và pEF6KCL/hB273_L2 được gọi là “hB273_H3/hB273_L2”, và kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H3 và pEF6KCL/hB273_L3 được gọi là “hB273_H3/hB273_L3”.

5)-4-2 Tinh chế kháng thể được làm giống như của người

Dịch nổi nuôi cấy thu được trong 5)-4-1 được tinh chế bằng quy trình hai bước bao gồm sắc ký ái lực rProtein A (ở từ 4 đến 6°C) và hydroxyapatit gồm (ở nhiệt độ trong phòng). Bước thay thế chất đệm sau khi tinh chế bằng cách sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Thứ nhất, từ 1100 đến 1200ml dịch nổi nuôi cấy được áp dụng vào MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột HiTrap (thể tích: 1ml) được nối theo dây) được làm cân bằng với PBS. Sau đó, rót tất cả dung dịch nuôi cấy vào cột, rửa cột bằng từ 15 đến 30ml PBS. Sau đó, tiến

hành tách rửa bằng 2M dung dịch arginin hydroclorua (độ pH = 4,0) và phần chứa kháng thể được gom lại. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5ml) được nối theo dãy), nhờ đó chất đệm được thay thế bằng chất đệm chứa 5mM natri phosphat, 50mM MES, và 20mM NaCl ở độ pH = 6,5. Hơn nữa, dung dịch kháng thể được cho vào thay thế chất đệm được áp dụng vào cột hydroxyapatit gồm (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., cột Bio-Scale CHT2-1 hydroxyapatit (thể tích: 2 ml)) được làm cân bằng với chất đệm chứa 5mM NaPi, 50mM MES, và 20mM NaCl ở độ pH = 6,5. Sau đó, tách rửa gradient nồng độ tuyến tính với natri clorua được thực hiện và phần chứa kháng thể được gom lại. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5 ml) được nối theo dãy), nhờ đó chất lỏng được thay thế bằng CBS (10 mM chất đệm xitrat chứa 140mM natri clorua, độ pH = 6,0). Cuối cùng, cô đặc dung dịch thu được bằng cách sử dụng Dụng cụ lọc Centrifugal UF VIVASPIN 20 (trọng lượng phân tử phân đoạn: 30 K, Sartorius Co., Ltd., ở 4°C), và nồng độ của IgG được điều chỉnh đến 1,0mg/ml hoặc lớn hơn và dung dịch thu được theo cách này được sử dụng làm mẫu tinh chế.

Ví dụ 6: Xác định hoạt tính của kháng thể B273 được làm giống như của người (hB273) (1)

6)-1 Đánh giá hoạt tính gắn kết của kháng thể hB273 bằng cách sử dụng Biacore

Hằng số phân ly của mỗi kháng thể kháng DR5 được làm giống như của người và rsDR5 được xác định bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) bằng phương pháp bắt giữ trong đó kháng thể được bắt giữ bằng kháng thể kháng IgG (Fc) người được làm cố định và việc xác định được thực hiện bằng cách sử dụng kháng nguyên làm chất phân tích. Kháng thể kháng IgG (Fc) người (Kit bắt giữ kháng thể người, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) được làm cố định cùng hóa trị trên chip cảm biến CM5 (BIAcore, Inc.) ở khoảng 10.000 RU

bằng phương pháp cặp đôi amin. Việc làm cố định cũng được thực hiện trên các tế bào tham chiếu theo cách tương tự. Đối với chất đệm chạy, HBS-EP (10 mM HEPES độ pH = 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% chất có hoạt tính bề mặt P20) được sử dụng. Phía trên chip có kháng thể kháng IgG (Fc) người được cố định trên đó, dung dịch kháng thể ở khoảng 20nM được bổ sung vào ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 60 giây và sau đó một loạt dung dịch pha loãng rsDR5 (3,13-50nM) được bổ sung vào ở tốc độ dòng 30 μ l/phút trong 120 giây và sau đó, kiểm soát pha phân ly trong 180 giây. Đối với dung dịch sinh ra, 3M magie clorua được bổ sung vào ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 30 giây. Trong phân tích dữ liệu, phần mềm phân tích (Biacore T100 Evaluation software, version 2.0.1) được sử dụng với mô hình gắn kết lần lượt và hằng số tốc độ kết hợp (kon), hằng số tốc độ phân ly (koff), và hằng số phân ly (KD; KD = koff/kon) được tính toán. Các kết quả thu được nhờ xác định bằng cách sử dụng Biacore đối với 9 kiểu kháng thể DR5 được làm giống như của người được thể hiện trong Fig.8.

6)-2 Hoạt tính gây chết tế bào In vitro của kháng thể hB273 kháng dòng tế bào ung thư ở người

Mảnh IgG Fc của dê kháng người của mảnh AffiniPure F(ab')₂ đặc hiệu (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., #109-006-098) được tạo ra ở 50 μ g/ml với 50mM Tris-HCl (độ pH = 8,5) được phân tán ở 45 μ L/giếng trong vi đĩa 96 giếng (được sản xuất bởi Corning Incorporated), và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C. Sau đó, rửa mỗi giếng hai lần bằng PBS, dịch nổi nuôi cấy 293F mà được cho phép tạo ra kháng thể ở 5)-4-1, kháng thể cB273 được tinh chế (Ví dụ 2-3-2) hoặc IgG người hiện có bán sẵn trên thị trường (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., #009-000-003) được bổ sung vào ở 50 μ L/giếng sao cho nồng độ cuối cùng của kháng thể nằm trong khoảng từ 150 đến 1,5ng/ml, và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C. Sau đó, rửa mỗi giếng hai lần bằng PBS, tế bào Jurkat được tạo ra ở 4,0 x 10⁴ tế bào/ml trong môi

trường RPMI 1640 chứa FBS 10% được bổ sung vào ở 50µl/giếng và được nuôi cấy trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 23 giờ. Lượng ATP có nguồn gốc từ tế bào có thể sống được xác định số lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm khả năng sống của tế bào huỳnh quang CellTiter-Glo (được sản xuất bởi Promega Corporation, #G7571), và tác dụng gây chết tế bào của mỗi trong số các kháng thể hB273 được đánh giá bằng cách sử dụng giá trị thu được từ miếng mà môi trường được bổ sung vào thay thế cho dung dịch kháng thể là 100%. Kết quả là, như được thể hiện trong Fig.9, đối với việc làm giống người của chuỗi nặng B273, xu hướng xảy ra là các kháng thể bao gồm chuỗi nặng kiểu H1 thể hiện tác dụng gây chết tế bào thấp hơn ở mức độ không đáng kể so với các kháng thể bao gồm chuỗi nặng kiểu H2 hoặc H3. Mặt khác, đối với việc làm giống người của chuỗi nhẹ B273, đã phát hiện ra rằng các kháng thể bao gồm bất kỳ trong số các chuỗi nhẹ kiểu L1, L2, và L3 được xác định có thể thể hiện về căn bản là tác dụng gây chết tế bào tương tự.

Ví dụ 7: Làm giống người kháng thể cB273 (2)

7)-1 Xác định B273 được làm giống như của người (hB273)

7)-1-1 Xác định trình tự axit amin của B273 được làm giống như của người

Dựa trên các kết quả xác định các kháng thể được làm giống như của người (1) được thể hiện trong các ví dụ 5 và 6, bằng cách chuyển một số gốc cho vào kháng thể nhận, các trình tự B273 được làm giống như của người được tạo cấu trúc như được mô tả trong ví dụ sau đây.

7)-1-2 Xác định trình tự axit amin của B273 được làm giống như của người

7)-1-2-1 Chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 20 (axit glutamic), 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39 (isoleuxin), 57 (lysin), 59 (serin), 60 (histidin), 62 (lysin), 63 (serin), 67 (isoleuxin), 86 (lysin), 87 (alanin), 95 (serin), 96 (threonin), 99 (histidin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi

nặng cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục trình tự với glutamin, valin, alanin, valin, lysin, valin, arginin, alanin, prolin, methionin, glyxin, methionin, arginin, valin, threonin, serin, tyrosin, serin, arginin, threonin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 39 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 40 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 39 và 40 cũng được thể hiện trong Fig.38.

7)-1-2-2 Chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39 (isoleuxin), 60 (histidin), 62 (lysin), 95 (serin), 96 (threonin), 99 (histidin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 116 (glycine), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục trình tự với valin, alanin, valin, lysin, valin, prolin, methionin, threonin, serin, tyrosin, serin, arginin, threonin, alanin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 41 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 42 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 41 và 42 cũng được thể hiện trong Fig.39.

7)-1-2-3 Chuỗi nặng kiểu hB273_H2-2:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 20 (axit glutamic), 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39 (isoleuxin), 60 (histidin), 62 (lysin), 95 (serin), 96 (threonin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 116 (glyxin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục

trình tự với glutamin, valin, alanin, valin, lysin, valin, prolin, methionin, threonin, serin, serin, arginin, threonin, alanin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nặng kiểu hB273_H2-2”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-2 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 43 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-2 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 44 trong Danh mục trình tự. Các trình tự của các SEQ ID NO: 43 và 44 cũng được thể hiện trong Fig.40.

7)-1-2-4 Chuỗi nặng kiểu hB273_H2-3:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39 (isoleuxin), 60 (histidin), 62 (lysin), 95 (serin), 96 (threonin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 116 (glycine), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cB273 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục trình tự với valin, alanin, valin, lysin, valin, prolin, methionin, threonin, serin, serin, arginin, threonin, alanin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nặng kiểu hB273_H2-3”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-3 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 45 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-3 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 46 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 45 và 46 cũng được thể hiện trong Fig.41.

7)-1-2-5 Chuỗi nặng kiểu hB273_H2-4:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 20 (axit glutamic), 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39 (isoleuxin), 60 (histidin), 62 (lysin), 95 (serin), 96 (threonin), 99 (histidin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) of the cB273 heavy chain được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục trình tự với glutamin, valin, alanin, valin, lysin, valin, prolin, methionin, threonin, serin, tyrosin, serin, arginin, threonin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi

là “chuỗi nặng kiểu hB273_H2-4”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-4 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 47 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-4 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 48 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 47 và 48 cũng được thể hiện trong Fig.42.

7)-1-2-6 Chuỗi nặng kiểu hB273_H2-5:

Chuỗi nặng B273 được làm giống như của người được tạo mô hình bằng cách thay thế axit amin các số 20 (axit glutamic), 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 39 (isoleuxin), 60 (histidin), 95 (serin), 96 (threonin), 99 (histidin), 103 (leuxin), 106 (threonin), 110 (serin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) of the cB273 heavy chain được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong Danh mục trình tự với glutamin, valin, alanin, valin, lysin, valin, prolin, threonin, serin, tyrosin, serin, arginin, threonin, leuxin và valin, tương ứng, được gọi là “chuỗi nặng kiểu hB273_H2-5”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-5 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 49 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-5 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 50 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 49 và 50 cũng được thể hiện trong Fig.43.

7)-2 Tạo cấu trúc các vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4, và hB273_H2-5

Các ADN chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4 hoặc hB273_H2-5 được thể hiện bởi axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 40 trong Danh mục trình tự, axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 42, axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 44, axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 46, axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 48 hoặc axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 50 được tổng hợp (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis

Service). Sau đó, mỗi trong số các mảnh ADN thu được bằng cách tách các ADN được tổng hợp bằng enzym giới hạn BlnI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nặng của kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF1FCCU) ở vị trí được tách bằng enzym giới hạn BlnI, nhờ đó các vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4, và hB273_H2-5 được tạo cấu trúc. Các vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF1FCCU/hB273_H1-1”, “pEF1FCCU/hB273_H2-1”, “pEF1FCCU/hB273_H2-2”, “pEF1FCCU/hB273_H2-3”, “pEF1FCCU/hB273_H2-4”, và “pEF1FCCU/hB273_H2-5”, tương ứng.

7)-3 Sản xuất kháng thể được làm giống như của người

7)-3-1 Sản xuất kháng thể được làm giống như của người

$1,2 \times 10^9$ tế bào của tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) trong pha phát triển loga được tạo hạt vào 1,2L môi trường biểu hiện FreeStyle 293 sạch (Invitrogen Corporation) và được nuôi cấy trong 1 giờ bằng cách lắc ở 90 vòng/phút ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. 3,6mg polyetylenimin (Polyscience #24765) được hòa tan trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Sau đó, vector biểu hiện chuỗi nặng (0,4mg) và vector biểu hiện chuỗi nhẹ (0,8mg) được tạo ra với PureLink HiPure Plasmid Kit (Invitrogen Corporation) được tạo huyền phù trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM. Sau đó, 20ml chất lỏng hỗn hợp vector biểu hiện/Opti-Pro SFM thu được được bổ sung vào 20ml chất lỏng hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM thu được được bổ sung vào và khuấy nhẹ hỗn hợp thu được và sau đó để yên trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được bổ sung vào tế bào FreeStyle 293F. Sau 3 giờ, Z-VAD-FMK (PEPTIDE INSTITUTE, Inc.) được bổ sung vào ở nồng độ cuối cùng 10μM và tiến hành lắc môi trường nuôi cấy ở 90 vòng/phút trong 7 ngày ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. Lọc dịch nuôi cấy thu được qua dụng cụ lọc nang dùng một lần (Advantec #CCS-045-E1H).

Kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết

hợp của pEF1FCCU/hB273_H1-1 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H1-1/hB273_L1”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-1 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H2-1/hB273_L1”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-2 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H2-2/hB273_L1”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-3 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H2-3/hB273_L1”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-4 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H2-4/hB273_L1”, và kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-5 và pEF6KCL/hB273_L1 được gọi là “hB273_H2-5/hB273_L1”.

7)-3-2 Tinh chế kháng thể được làm giống như của người

Dịch nổi nuôi cấy thu được ở 7)-3-1 trên đây được tinh chế bằng quy trình hai bước bao gồm sắc ký ái lực rProtein A (ở từ 4 đến 6°C) và hydroxyapatit gồm (ở nhiệt độ trong phòng). Bước thay thế chất đệm sau khi tinh chế bằng cách sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Thứ nhất, từ 1100 đến 1200ml dịch nổi nuôi cấy được áp dụng vào MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột HiTrap (thể tích: 1ml) được kết nối theo dãy) được làm cân bằng với PBS. Sau đó, rót tất cả dung dịch nuôi cấy vào cột, rửa cột bằng từ 15 đến 30ml PBS. Sau đó, tiến hành tách rửa bằng 2M dung dịch arginin hydroclorua (độ pH = 4,0) và gom phần chứa kháng thể. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5ml) được kết nối theo dãy), nhờ đó chất đệm được thay thế bằng chất đệm chứa 5mM dung dịch phosphat, 50mM MES, và 20 mM NaCl ở độ pH = 6,5. Hơn nữa, dung dịch kháng

thể được cho vào thay thế chất đệm được áp dụng vào cột hydroxyapatit gồm (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., cột Bio-Scale CHT2-1 hydroxyapatit (thể tích: 2ml)) được làm cân bằng với chất đệm chứa 5mM NaPi, 50mM MES, và 20 mM NaCl ở độ pH = 6,5. Sau đó, tiến hành tách rửa gradient nồng độ tuyến tính với ođi clorua và gom phần chứa kháng thể. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5 ml) được kết nối theo dây), nhờ đó chất lỏng được thay thế bằng CBS (10mM chất đệm xitrat chứa 140mM natri clorua, độ pH = 6,0). Cuối cùng, cô đặc dung dịch thu được bằng cách sử dụng thiết bị lọc Centrifugal UF VIVASPIN 20 (trọng lượng phân tử phân đoạn: 30 K, Sartorius Co., Ltd., ở 4°C) và điều chỉnh nồng độ IgG đến 1,0mg/ml hoặc lớn hơn và dung dịch thu được theo cách này được sử dụng làm mẫu tinh chế.

Ví dụ 8: Xác định hoạt tính của kháng thể B273 được làm giống như của người (hB273) (2)

8)-1 Đánh giá hoạt tính gắn kết của kháng thể hB273 bằng cách sử dụng Biacore

Hàng số phân ly của mỗi trong số các kháng thể kháng DR5 được làm giống như của người và rsDR5 được xác định bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) bằng phương pháp bắt giữ trong đó kháng thể được bắt giữ bằng kháng thể kháng IgG (Fc) người được làm giống như của người và tiến hành xác định bằng cách sử dụng kháng nguyên làm chất phân tích. Kháng thể kháng IgG (Fc) người (Kháng thể người Capture Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) được làm cố định cùng hóa trị trên chip cảm biến CM5 (BIAcore, Inc.) ở khoảng 10.000 RU bằng phương pháp cặp đôi amin. Việc cố định cũng được thực hiện trên tế bào tham chiếu theo cách tương tự. Đối với chất đệm chạy, HBS-EP (10mM HEPES độ pH = 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA và 0,05% chất có hoạt tính bề mặt P20) được sử dụng. Đối với chip có kháng thể kháng IgG (Fc) người được làm cố định trên đó, dung dịch kháng thể ở khoảng 20nM được bỏ

sung vào ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 60 giây và sau đó, một loạt dung dịch pha loãng rsDR5 (3,13-50nM) được bổ sung vào ở tốc độ dòng 30 μ l/phút trong 120 giây và sau đó, kiểm soát pha phân ly trong 180 giây. Đối với dung dịch tái sinh, 3M natri clorua được bổ sung vào ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 30 giây. Trong phân tích dữ liệu, phần mềm phân tích (Biacore T100 Evaluation software, version 2.0.1) được sử dụng với mô hình gắn kết lần và hằng số tốc độ kết hợp (kon), hằng số tốc độ phân ly (koff), và hằng số phân ly (KD; KD = koff/kon) được tính toán. Kết quả thu được nhờ xác định bằng cách sử dụng Biacore trong 6 loại kháng thể DR5 được làm giống như của người được thể hiện trong Fig.10.

8)-2 Hoạt tính gây chết tế bào In vitro của kháng thể hB273 đối với dòng tế bào ung thư của người

Mảnh IgG Fc dê kháng người của mảnh AffiniPure F(ab')₂ đặc hiệu (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., #109-006-098) được tạo ra ở 50 μ g/ml với 50mM Tris-HCl (độ pH = 8,5) được phân tán ở 45 μ L/giếng trong đĩa vi chuẩn 96 giếng (được sản xuất bởi Corning Incorporated), và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C. Sau đó, rửa mỗi giếng hai lần bằng PBS, dịch nuôi cấy 293F mà được cho phép tạo ra kháng thể ở 7)-3-1 được bổ sung vào ở 50 μ L/giếng sao cho nồng độ cuối cùng của kháng thể nằm trong khoảng từ 150 đến 1,5ng/ml, và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C. Sau đó, rửa mỗi giếng hai lần bằng PBS, tế bào Jurkat được tạo ra ở 4,0 x 10⁴ tế bào/ml trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS được bổ sung vào ở 50 μ l/giếng và được nuôi cấy trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 23 giờ. Lượng ATP có nguồn gốc từ tế bào có khả năng sống được xác định về mặt số lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm khả năng sống tế bào huỳnh quang CellTiter-Glo (được sản xuất bởi Promega Corporation, #G7571), và tác dụng gây chết tế bào của mỗi trogn số các kháng thể hB273 được đánh giá bằng cách sử dụng giá trị thu được từ giếng mà môi trường được bổ sung vào để thay cho dung dịch kháng thể là 100%. Kết quả là, như được thể hiện trong Fig.11, xu hướng

được quan sát đối với kháng thể hB273_H1-1/L1 thể hiện hoạt tính gây chết tế bào cao hơn so với kháng thể hB273_H1/L1, dựa trên kháng thể, kháng thể hB273_H1-1/L1 đã được tạo mô hình. Mặt khác, các kháng thể từ hB273_H2-1/L1 đến hB273_H2-5/L1 thể hiện về căn bản là tác dụng gây chết tế bào như kháng thể hB273_H2/L1, dựa trên kháng thể, các kháng thể từ hB273_H2-1/L1 đến hB273_H2-5/L1 đã được tạo mô hình.

Ví dụ 9: Loại bỏ vị trí amin hóa khử khỏi kháng thể cB273 CDR

9)-1 Tạo mô hình thể đột biến và cấu trúc vectơ biểu hiện

9)-1-1 Tạo mô hình thể đột biến

Thông thường, việc amin hóa khử asparagin ở protein xảy ra thông qua việc tạo thành trạng thái chuyển tiếp của succinimit vòng giữa asparagin và axit amin liền kề trên vị trí tận cùng C (Geiger, T. and Clarke, S. (1987) Deamidation, Isomerization, and racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. J. Biol. Chem. 262, 785-794). Yếu tố giới hạn tốc độ đối với sự tạo thành trạng thái chuyển tiếp của succinimit vòng là kích cỡ của chuỗi phụ axit amin liền kề và do đó, glyxin mà là chuỗi phụ nhỏ nhất có thể đạt được tốc độ amin hóa khử nhanh nhất. Mặt khác, bằng cách thay thế nhóm liền kề ở phía tận cùng C với axit amin có chuỗi phụ lớn, tốc độ amin hóa khử có thể được ngăn chặn. Kháng thể B273 có trình tự -N-G- (asparagin-glyxin) mà dễ bị amin hóa khử trong cả chuỗi nhẹ L và chuỗi nặng H. Do đó, các tác giả sáng chế đã tạo ra các đột biến điểm trong đó nhóm liền kề được thay đổi từ glyxin thành lysin, phenylalanin, leuxin hoặc axit glutamic, mỗi trong số chúng có chuỗi phụ lớn hơn glyxin. Tức là, việc tạo mô hình đột biến được thực hiện sao cho trong chuỗi H, trình tự -N-G- (asparagin-glyxin) được tạo đột biến thành trình tự -N-E- (asparagin-axit glutamic) và trong chuỗi L, trình tự -N-G- (asparagin-glyxin) được tạo đột biến thành trình tự -N-L- (asparagin-leuxin), trình tự -N-F- (asparagin-phenylalanin), trình tự -N-K- (asparagin-lysin) hoặc trình tự -N-E-

(asparagin-axit glutamic).

9)-1-2 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NE

Bằng cách sử dụng pEF6KCL/hB273_L1 mà là vector biểu hiện chuỗi nhẹ hB273_L1 được tạo ra ở Ví dụ 5 làm mẫu, mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ mồi và mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ mồi B được thất với nhau bằng cách mở rộng phần chồng chéo PCR bằng cách sử dụng bộ mồi C. Mảnh ADN thu được bằng cách tách mảnh ADN thu được theo cách này bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể người thông thường (pEF6KCL) ở vị trí được tách bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NE trong đó glyxin ở axit amin số 54 của SEQ ID NO: 28 được thay thế bằng axit glutamic được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF6KCL/hB273_L1-NE”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NE được thể hiện bởi SEQ ID NO: 51 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NE được thể hiện bởi SEQ ID NO: 52 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 51 và 52 cũng được thể hiện trong Fig.44.

Bộ đoạn mồi A

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 trong Danh mục trình tự)

5'-ccaatgcaggttaagtgttctcattgctatggaccagtgactg-3' (L-NE-R2: SEQ ID NO: 54 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn mồi B

5'-cagtcactggtccatagcaatgagaacacttacctgcattgg-3' (L-NE-F2: SEQ ID NO: 55 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccaccggtttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn mỗi C

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccgtttaaacgggccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 trong Danh mục trình tự)

9)-1-3 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NF

Bằng cách sử dụng pEF6KCL/hB273_L1 mà là vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1 được tạo ra ở Ví dụ 5 là mẫu, mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ mồi A và mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ mồi B được thất với nhau bằng PCR kéo dài chông chéo bằng cách sử dụng bộ mồi C. Mảnh ADN thu được bằng cách tách mảnh ADN thu được theo cách này bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF6KCL) ở vị trí được tách bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NF trong đó glyxin ở axit amin số 54 của SEQ ID NO: 28 được thay thế bằng phenylalanin được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF6KCL/hB273_L1-NF”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NF được thể hiện bởi SEQ ID NO: 57 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NF được thể hiện bởi SEQ ID NO: 58 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 57 và 58 cũng được thể hiện trong Fig.45.

Bộ mồi A

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 trong Danh mục trình tự)

5'-ccaatgcaggttaagtgttgaaattgctatggaccagtgactg-3' (L-NF-R2: SEQ ID NO: 59 trong Danh mục trình tự)

Bộ mồi B

5'-cagtcactgggtccatagcaatttcaacacttacctgcattgg-3' (L-NF-F2: SEQ ID NO: 60 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccggttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 trong Danh mục trình tự)

Bộ mồi C

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatgggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccggttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 trong Danh mục trình tự)

9)-1-4 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NK

Bằng cách sử dụng pEF6KCL/hB273_L1 mà là vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1 được tạo ra ở Ví dụ 5 làm mẫu, mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ mồi A và mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ mồi B được thất với nhau bằng PCR kéo dài chồng chéo bằng cách sử dụng bộ mồi C. Mảnh ADN thu được bằng cách tách mảnh ADN thu được theo cách này bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF6KCL) ở vị trí được tách bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NK trong đó glyxin ở axit amin số 54 của SEQ ID NO: 28 được thay thế bằng lysin được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF6KCL/hB273_L1-NK”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NK được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NK được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 61 và 62 cũng được thể hiện trong Fig.46.

Bộ đoạn mồi A

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatgggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 trong Danh mục

trình tự)

5'-ccaatgcaggttaagtgttcttattgctatggaccagtgactg-3' (L-NK-R2: SEQ ID NO: 63 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn môi B

5'-cagtcactgggccatagcaataagaacacttacctgcattgg-3' (L-NK-F2: SEQ ID NO: 64 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccggttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn môi C

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatgggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccggttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 trong Danh mục trình tự)

9)-1-5 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NL

Bằng cách sử dụng pEF6KCL/hB273_L1 mà là vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1 được tạo ra ở Ví dụ 5 làm mẫu, mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi A và mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi B được thất với nhau bằng PCR kéo dài chồng chéo bằng cách sử dụng bộ đoạn môi C. Mảnh ADN thu được bằng cách tách mảnh ADN bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF6KCL) ở vị trí được tách bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI, nhờ đó vect biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NL trong đó glyxin ở axit amin số 54 của SEQ ID NO: 28 được thay thế bằng leuxin được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF6KCL/hB273_L1-NL”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NL được thể hiện bởi SEQ ID NO: 65 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nhẹ

kiểu hB273_L1-NL được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 65 và 66 cũng được thể hiện trong Fig.47.

Bộ đoạn môi A

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 trong Danh mục trình tự)

5'-ccaatgcaggttaagtgttcagattgctatggaccagtgc-3' (L-NL-R2: SEQ ID NO: 67 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn môi B

5'-cagtcactgggtccatagcaatctgaacacttacctgcattgg-3' (L-NL-F2: SEQ ID NO: 68 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccggtttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn môi C

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccggtttaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 trong Danh mục trình tự)

9)-1-6 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1-NE

Bằng cách sử dụng pEF1FCCU/hB273_H2-1 mà là vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1 được tạo ra ở Ví dụ 7 làm mẫu, mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi A và mảnh ADN thu được bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi B được thất cùng với nhau nhờ PCR kéo dài chông chéo bằng cách sử dụng bộ đoạn môi C. Mảnh ADN thu được bằng cách tách mảnh ADN thu được theo cách này bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF1FCCU) ở vị trí được tách bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1-NE trong đó glyxin ở

vị trí axit amin số 75 của SEQ ID NO: 42 được thay thế bằng axit glutamic được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE”.

Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1-NE được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69 trong Danh mục trình tự. Hơn nữa, trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1-NE được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 trong Danh mục trình tự. Các trình tự SEQ ID NO: 69 và 70 cũng được thể hiện trong Fig.48.

Bộ đoạn môi A

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatgaaacacc-3' (H-F1: SEQ ID NO: 71 trong Danh mục trình tự)

5'-ctggttgtagaaggtgtcctcggttaggggtgaaccggcc-3' (H-NE-R2: SEQ ID NO: 72 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn môi B

5'-ggccggttcaaccctacaacgaggacaccttctacaaccag-3' (H-NE-F2: SEQ ID NO: 73 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccgtttaaacgggcccgatatctc-3' (H-R1: SEQ ID NO: 74 trong Danh mục trình tự)

Bộ đoạn môi C

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatgaaacacc-3' (H-F1: SEQ ID NO: 71 trong Danh mục trình tự)

5'-ggatgccacccgtttaaacgggcccgatatctc-3' (H-R1: SEQ ID NO: 74 trong Danh mục trình tự)

9)-2 Sản xuất kháng thể hB273 được biến đổi CDR

9)-2-1 Sản xuất kháng thể hB273 được biến đổi CDR

$1,2 \times 10^9$ tế bào của tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) trong pha sinh trưởng loga được tạo hạt vào môi trường biểu hiện FreeStyle 293 sạch (Invitrogen Corporation) và được nuôi cấy trong 1 giờ bằng cách lắc ở 90 vòng/phút

ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. 3,6mg polyetylenimin (Polyscience #24765) được hòa tan trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Sau đó, vector biểu hiện chuỗi nặng (0,4mg) và vector biểu hiện chuỗi nhẹ (0,8mg) được tạo ra với PureLink HiPure Plasmid Kit (Invitrogen Corporation) được tạo huyền phù trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM. Sau đó, 20ml chất lỏng hỗn hợp vector biểu hiện/Opti-Pro SFM thu được được bổ sung vào 20ml chất lỏng hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM thu được và khuấy nhẹ hỗn hợp thu được và sau đó để yên trong 5 phút. Sau đó, bổ sung hỗn hợp này vào tế bào FreeStyle 293F. Sau 3 giờ, Z-VAD-FMK (PEPTIDE INSTITUTE, Inc.) được bổ sung vào ở nồng độ cuối cùng 10µM và tiến hành lắc môi trường nuôi cấy ở 90 vòng/phút trong 7 ngày ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. Lọc dịch nổi nuôi cấy thu được qua dụng cụ lọc nang dùng một lần (Advantec #CCS-045-E1H).

Kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE và pEF6KCL/hB273_L1-NE được gọi là “hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE và pEF6KCL/hB273_L1-NF được gọi là “hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF”, kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE và pEF6KCL/hB273_L1-NK được gọi là “hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK”, và kháng thể được làm giống như của người của cB273 thu được nhờ sự kết hợp của pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE và ppEF6KCL/hB273_L1-NL được gọi là “hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL”.

9)-2-2 Tinh chế kháng thể hB273 được làm biến đổi CDR

Dịch nổi nuôi cấy thu được ở 9)-2-1 trên đây được tinh chế theo quy trình hai bước bao gồm sắc ký ái lực rProtein A (ở từ 4 đến 6°C) và hydroxyapatit gồm (ở nhiệt độ trong phòng). Bước thay thế chất đệm sau khi tinh chế bằng cách sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm được thực hiện ở nhiệt độ

trong phòng. Thứ nhất, từ 1100 đến 1200ml dịch nuôi cấy được áp dụng vào MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột HiTrap (thể tích: 1ml) được kết nối theo dãy) được làm cân bằng với PBS. Rót tất cả dung dịch nuôi cấy vào cột, rửa cột bằng từ 15 đến 30ml PBS. Sau đó, tiến hành tách rửa bằng 2M dung dịch arginin hydroclorua (độ pH = 4,0), và gom phần chứa kháng thể. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5ml) được kết nối theo dãy), nhờ đó chất đệm được thay thế bằng chất đệm chứa 5mM natri phosphat, 50mM MES, và 20mM NaCl ở độ pH = 6,5. Hơn nữa, dung dịch kháng thể được cho vào thay thế chất đệm được áp dụng vào cột hydroxyapatit gồm (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., cột Bio-Scale CHT2-1 hydroxyapatit (thể tích: 2 ml)) được làm cân bằng với chất đệm chứa 5mM NaPi, 50 mM MES, và 20 mM NaCl ở độ pH = 6,5. Sau đó, tách rửa gradient nồng độ tuyến tính bằng natri clorua được thực hiện và gom phần chứa kháng thể. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5ml) được kết nối theo dãy), nhờ đó chất lỏng được thay thế bằng CBS (10 mM chất đệm xitrat chứa 140mM natri clorua, độ pH = 6,0). Cuối cùng, cô đặc dung dịch thu được bằng cách sử dụng Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN 20 (trọng lượng phân tử phân đoạn: 30 K, Sartorius Co., Ltd., ở 4°C) và nồng độ IgG được điều chỉnh đến 1,0mg/ml hoặc lớn hơn và dung dịch thu được theo cách này được sử dụng làm mẫu tinh chế.

Ví dụ 10: Hoạt tính xác định kháng thể hB273 được biến đổi CDR

10)-1 Đánh giá hoạt tính gắn kết của kháng thể hB273 được biến đổi CDR bằng cách sử dụng Biacore

Hàng số phân lý của mỗi trong số các kháng thể kháng DR5 được làm giống như của người và rsDR5 được xác định bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) bằng phương pháp bắt giữ trogn đó kháng thể

được bắt giữ bằng kháng thể kháng IgG (Fc) người được làm cố định và tiến hành xác định bằng cách sử dụng kháng nguyên làm chất phân tích. Kháng thể kháng IgG (Fc) người (Kháng thể người Capture Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) được cố định cùng hóa trị trên chip cảm biến CM5 (BIAcore, Inc.) ở khoảng 10.000 RU bằng phương pháp cặp đôi amin. Việc làm cố định cũng được thực hiện trên tế bào tham chiếu theo cách tương tự. Đối với chất đệm chạy, HBS-EP (10 mM HEPES độ pH = 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% chất có hoạt tính bề mặt P20) được sử dụng. Đối với chip có kháng thể kháng IgG (Fc) người được cố định trên đó, dung dịch kháng thể ở khoảng 20nM được bổ sung vào ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 60 giây và sau đó, một loạt dung dịch pha loãng rsDR5 (3,13-50nM) được bổ sung vào ở tốc độ dòng 30 μ l/phút trong 120 giây và sau đó, kiểm soát pha phân ly trong 180 giây. Đối với dung dịch tái sinh, 3M magie clorua được bổ sung vào ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 30 giây. Trong phân tích dữ liệu, phần mềm phân tích (Biacore T100 Evaluation software, version 2.0.1) được sử dụng theo mô hình gắn kết lần lượt và hằng số tốc độ kết hợp (kon), hằng số tốc độ phân ly (koff) và hằng số phân ly (KD; KD = koff/kon) được tính toán. Các kết quả thu được nhờ xác định bằng cách sử dụng Biacore đối với 4 kiểu kháng thể DR5 được làm giống như của người được thể hiện trong Fig.12.

10)-2 Xác định tính ổn định nhiệt của kháng thể kháng DR5 được làm giống như của người và đột biến của nó bằng cách sử dụng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC)

Việc xác định tính ổn định nhiệt được thực hiện bằng cách sử dụng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC). Mẫu được hòa tan trong chất đệm CBS (chứa 10mM axit xitric và 140mM NaCl và được tạo ở độ pH = 6,0) ở 0,5mg/ml, và 400 μ l nước xuyết của nó được sử dụng làm dung dịch mẫu để xác định DSC. Các điều kiện xác định DSC được đặt ra như sau: nhiệt độ ban đầu: 20°C; nhiệt độ cuối cùng: 100°C; tốc độ tăng nhiệt độ: 200°C/giờ; thời gian lọc: 2 giây; và phương thức phản hồi: chậm. Đối với dung dịch tham chiếu, CBS được sử dụng. Đối với thiết bị xác định

DSC, VP-Capillary DSC Platform được sản xuất bởi MicroCal, Inc. (US) (currently GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) được sử dụng đối với tất cả các lần xác định. Hiệu chỉnh đường giới hạn được thực hiện bằng cách trừ đi đường giới hạn (đường cong quét cũng thu được bằng cách lọc tế bào mẫu với dung dịch tham chiếu) từ đường cong quét thu được từ dung dịch mẫu. Giá trị nhiệt độ đỉnh cao nhất trong toàn bộ biểu đồ nhiệt được xác định là trung điểm làm biến tính do nhiệt T_m của vùng Fab. Các kết quả xác định DSC của 4 kiểu kháng thể DR5 được làm giống như của người được thể hiện trong Fig.13.

10)-3 Hoạt tính gây chết tế bào In vitro của kháng thể được biến đổi CDR đối với dòng tế bào ung thư của người

Mảnh IgG Fc của dê kháng người của mảnh AffiniPure F(ab')₂ đặc hiệu (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., #109-006-098) được tạo ra ở 50µg/ml với 50mM Tris-HCl (độ pH = 8,5) được phân tán ở 45µL/giếng trong vi đĩa 96 giếng (được sản xuất bởi Corning Incorporated), và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C. Sau đó, rửa mỗi giếng hai lần bằng PBS, dịch nổi nuôi cấy 293F mà được cho phép tạo ra kháng thể ở 9)-2-1 được bổ sung vào ở 50µL/giếng sao cho nồng độ cuối cùng của kháng thể nằm trong khoảng từ 150 đến 1,5ng/ml, và đĩa được để cho đứng yên qua đêm ở 4°C. Sau đó, rửa mỗi giếng hai lần bằng PBS, các tế bào Jurkat được tạo ra ở $4,0 \times 10^4$ tế bào/ml trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS được bổ sung vào ở 50µl/giếng và được nuôi cấy trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 23 giờ. Lượng ATP có nguồn gốc từ tế bào có thể sống được các định về mặt số lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm tế bào huỳnh quang CellTiter-Glo (được sản xuất bởi Promega Corporation, #G7571), và tác dụng gây chết tế bào của mỗi trong số các kháng thể hB273 được đánh giá bằng cách sử dụng giá trị thu được từ giếng mà môi trường được bổ sung vào thay cho dung dịch kháng thể là 100%. Tác dụng gây chết tế bào của mỗi trong số 4 kiểu

kháng thể được biến đổi CDR được thể hiện trong Fig.14.

10)-4 Tác dụng hoạt hóa Caspase-3/7 và tác dụng gây chết tế bào in vitro của kháng thể hB273_H2-1-NE/L1-NK đối với các dòng tế bào ung thư ở người

Mỗi dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 và dòng tế bào u nguyên bào đệm của người U-87MG được tạo ra ở $1,1 \times 10^5$ tế bào/ml trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS hoặc môi trường MEM (Minimum Essential Medium) chứa 10% FBS và được bổ sung vào vi đĩa 96 giếng đáy sạch màu trắng (được sản xuất bởi Corning Incorporated) ở 45µl/giếng và được nuôi cấy qua đêm trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Kháng thể hB273_H2-1-NE/L1-NK, kháng thể cB273 hoặc IgG người (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) được trộn với cùng nồng độ của mảnh IgG Fcγ dê kháng người của AffiniPure đặc hiệu (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., #109-005-098), và hỗn hợp thu được được bổ sung vào ở 5µl/giếng sao cho nồng độ cuối cùng của kháng thể hB273_H2-1-NE/L1-NK, kháng thể cB273 hoặc IgG người nằm trong khoảng từ 10.000 đến 0,1ng/ml và tế bào được nuôi cấy trong các điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 4 giờ. Hoạt tính của caspase-3/7 trong mỗi giếng được xác định bằng phát hiện quang (được sản xuất bởi Perkin Elmer, Inc.) bằng cách sử dụng kit thử nghiệm Caspase-Glo 3/7 (được sản xuất bởi Promega Corporation, #G8093). Việc xác định được thực hiện sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút theo quy trình kèm theo kit. Sau đó, hoạt tính của caspase-3/7 được đánh giá bằng cách sử dụng giá trị thu được từ giếng mà môi trường được bổ sung vào để thay cho dung dịch kháng thể là 100%. Hơn nữa, tác dụng gây chết tế bào in vitro được đánh giá bằng cách xác định lượng ATP ở 24 giờ sau khi xử lý bằng kháng thể theo phương pháp được thể hiện trong ví dụ 3-3. Kết quả là, đã phát hiện ra rằng kháng thể hB273_H2-1-NE/L1-NK có tác dụng hoạt hóa caspase-3/7 và tác dụng gây chết tế bào so với tác dụng của kháng thể cB273 (Fig.15).

Ví dụ 11: Tác dụng kháng khối u In vivo của kháng thể cB273

11)-1 Hoạt tính kháng khối u của kháng thể cB273

11)-1-1 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được cấy dòng tế bào ung thư ruột kết của người COLO 205

2×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư ruột kết của người COLO 205 (mua được từ ATCC) được cấy dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông (CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrIcrlj, mua được từ Charles River Laboratories Japan, Inc.). Vào các ngày 7, 14, và 21 sau khi cấy, kháng thể cB273 được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch tai ở liều 1, 3 hoặc 10 mg/kg ($n = 10$). Trục lớn và trục nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước đo số điện tử (được sản xuất bởi Mitutoyo Corporation), và thể tích khối u được tính toán theo công thức tính toán sau đây.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = 1/2 \times (\text{Trục nhỏ})^2 (\text{mm}) \times (\text{Trục lớn})^2 (\text{mm})$$

Các kết quả được thể hiện trong Fig.16. Sự thoái hóa hoàn toàn khối u quan sát được ở tất cả chuột trong nhóm dùng kháng thể cB273.

11)-1-2 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được ghép dòng tế bào ung thư tuyến tụy người MIAPaCa-2

3×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư tuyến tụy người MIAPaCa-2 (được được từ ATCC) được cấy dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào các ngày 11, 19, 26, và 33 sau khi ghép, kháng thể cB273 được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 3 hoặc 10mg/kg ($n = 10$). Theo cách tương tự được mô tả trên đây, trục lớn và trục nhỏ của khối u được ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.17. Tốc độ ức chế sự phát triển của khối u vào ngày 39 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 73,5% trong nhóm dùng 3mg/kg và 77,4% trong nhóm dùng 10mg/kg.

11)-1-3 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được cấy ghép dòng tế bào u nguyên bào đệm của người U-87MG

5×10^6 tế bào của dòng tế bào u nguyên bào đệm của người U-87MG (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào các ngày 4, 11, 18, và 25 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 1, 3 hoặc 10mg/kg ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.18. Tốc độ ức chế sự phát triển của khối u vào ngày 32 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 99,7% trong nhóm dùng 1mg/kg, 97,8% trong nhóm dùng 3mg/kg và 98,0% trong nhóm dùng 10mg/kg. Hơn nữa, sự thoái hóa hoàn toàn khối u được quan sát ở 2 trong số 10 chuột trong nhóm dùng 1mg/kg, 5 trong số 10 chuột trong nhóm dùng 3mg/kg và 3 trong số 10 chuột trong nhóm dùng 10mg/kg.

11)-1-4 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được cấy ghép dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H2122 (kết hợp với paclitaxel và carboplatin)

5×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H2122 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da vào vùng nách của chuột trụi lông. Vào các ngày 13 và 20 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 10mg/kg. Paclitaxel được dùng dưới da ở liều 6,25mg/kg vào các ngày 13, 14, 15, 16, và 17 sau khi cấy ghép. Carboplatin được dùng trong bụng ở liều 100mg/kg vào ngày 13 sau khi cấy ghép ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.19. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 41 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 99,6% trong nhóm dùng kháng thể cB273, 10,2% trong nhóm dùng kết hợp paclitaxel và carboplatin, và 99,7% trong nhóm dùng kết hợp kháng thể cB273, paclitaxel, và carboplatin.

11)-1-5 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được cấy ghép dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H460 (kết hợp với paclitaxel và carboplatin)

5×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H460 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào ngày 6 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 được dùng trong bụng cho chuột mang khối u ở liều 10mg/kg. Paclitaxel được dùng dưới da ở liều 6,25mg/kg vào các ngày 6, 7, 8, 9, và 10 sau khi cấy ghép. Carboplatin được dùng trong bụng ở liều 100mg/kg vào ngày 6 sau khi cấy ghép ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.20. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 16 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 43,3% trong nhóm dùng kháng thể cB273, 66,4% trong nhóm dùng kết hợp paclitaxel và carboplatin, và 79,6% trong nhóm dùng kết hợp kháng thể cB273, paclitaxel, và carboplatin.

11)-1-6 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được cấy ghép dòng tế bào ung thư ruột kết của người DLD-1 (kết hợp với CPT-11)

5×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư ruột kết của người DLD-1 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào ngày 35 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 được dùng trong bụng cho chuột mang khối u ở liều 10mg/kg. CPT-11 được dùng trong bụng ở liều 80mg/kg vào các ngày 35, 40, và 43 sau khi cấy ghép ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.21. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 55 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 25,9% trong nhóm dùng kháng thể cB273, 29,5% trong nhóm dùng CPT-11 và 72,7% trong nhóm dùng kết hợp kháng thể cB273 và CPT-11.

11)-1-7 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được cấy ghép dòng tế bào ung thư

ruột kết của người HCT-15 (kết hợp với CPT-11)

5×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trại lông. Vào ngày 7 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 10mg/kg. CPT-11 được dùng trong bụng ở liều 80mg/kg vào các ngày 7, 10, và 14 sau khi cấy ghép ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.22. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 31 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 52,8% trong nhóm dùng kháng thể cB273, 83,5% trong nhóm dùng CPT-11, và 97,8% trong nhóm dùng kết hợp kháng thể cB273 và CPT-11.

11)-1-8 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trại lông được cấy ghép dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-116 (kết hợp với CPT-11)

1×10^7 tế bào của dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-116 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trại lông. Vào ngày 7 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 10 mg/kg. CPT-11 được dùng trong bụng ở liều 65 mg/kg vào các ngày 7, 10, và 14 sau khi cấy ghép ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.23. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 28 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 13,9% trong nhóm dùng kháng thể cB273, 89,8% trong nhóm dùng CPT-11, và 99,7% trong nhóm dùng kết hợp kháng thể cB273 và CPT-11.

11)-1-9 Hoạt tính kháng khối u ở chuột trại lông được cấy ghép dòng tế bào khối u ác tính của người A375 (kết hợp với vinblastin)

2×10^6 tế bào của dòng tế bào khối u ác tính của người A375 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào các ngày 10, 17, và 24 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 10 mg/kg. Vinblastin được dùng qua tĩnh mạch đuôi ở liều 10mg/kg vào các ngày 10 sau khi cấy ghép ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.24. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 46 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 53,1% trong nhóm dùng kháng thể cB273, 43,6% trong nhóm dùng vinblastin và 100% trong nhóm dùng kết hợp kháng thể cB273 và vinblastin và sự thoái hóa hoàn toàn khối u được quan sát ở tất cả chuột trong nhóm dùng kết hợp kháng thể cB273 và vinblastin.

11)-2 So sánh hoạt tính kháng khối u giữa kháng thể cB273 và conatumumab

11)-2-1 Bào chế conatumumab

Conatumumab được bào chế dựa trên các trình tự axit amin của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được mô tả trong WHO Drug Information, Vol. 22, No. 2, 2008, pp. 129-130.

11)-2-1-1 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ conatumumab

ADN chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ conatumumab được thể hiện bởi axit amin các số từ 21 đến 130 của SEQ ID NO: 76 được tổng hợp (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Sau đó, mảnh ADN thu được bằng cách tách ADN được tổng hợp bằng các enzym giới hạn NdeI và BsiWI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF6KCL) ở vị trí được tách bằng các enzym giới hạn NdeI và BsiWI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nhẹ conatumumab được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF6KCL/Conatumumab_L”.

11)-2-1-2 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng conatumumab

ADN chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng conatumumab được thể hiện bởi axit amin các số từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 78 trong Danh mục trình tự được tổng hợp (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Sau đó, mảnh ADN thu được bằng cách tách ADN được tổng hợp bằng enzym giới hạn BlnI được lồng vào vector biểu hiện chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người thông thường (pEF1FCCU) ở vị trí được tách bằng enzym giới hạn BlnI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nặng conatumumab được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được theo cách này được gọi là “pEF1FCCU/Conatumumab_H”.

11)-2-1-3 Bào chế conatumumab

$1,2 \times 10^9$ tế bào của tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) trong pha phát triển loga được tạo hạt vào 1,2L môi trường biểu hiện FreeStyle 293 sạch (Invitrogen Corporation) và được nuôi cấy trong 1 giờ bằng cách lắc ở 90 vòng/phút ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. 3,6mg polyetylenimin (Polyscience #24765) được hòa tan trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Sau đó, vector biểu hiện chuỗi nặng pEF1FCCU/Conatumumab_H (0,4mg) và vector biểu hiện chuỗi nhẹ pEF6KCL/Conatumumab_L (0,8mg) được tạo ra bằng PureLink HiPure Plasmid Kit (Invitrogen Corporation) được tạo huyền phù trong 20ml môi trường Opti-Pro SFM. Sau đó, 20ml chất lỏng hỗn hợp vector biểu hiện/Opti-Pro SFM thu được được bổ sung vào 20ml chất lỏng hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM thu được và khuấy nhẹ hỗn hợp thu được và sau đó để yên trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được bổ sung vào tế bào FreeStyle 293F và tiến hành lắc môi trường nuôi cấy ở 90 vòng/phút trong 7 ngày ở 37°C trong thiết bị ủ CO₂ 8%. Lọc dịch nổi nuôi cấy thu được qua dụng cụ lọc nang dùng một lần (Advantec #CCS-045-E1H).

11)-2-1-4 Tinh chế conatumumab

Dịch nổi nuôi cấy thu được trong 11)-2-1-3 trên đây được tinh chế bằng quy trình hai bước bao gồm sắc ký ái lực rProtein A (ở từ 4 đến 6°C) và hydroxyapatit

gồm (ở nhiệt độ trong phòng). Bước thay thế chất đệm sau khi tinh chế bằng cách sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Thứ nhất, từ 1100 đến 1200ml dịch nổi nuôi cấy được áp dụng vào MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột HiTrap (thể tích: 1ml) được kết nối theo dãy) được làm cân bằng với PBS. Sau đó, rót dung dịch nuôi cấy vào cột, rửa cột bằng từ 15 đến 30ml PBS. Sau đó, tiến hành tách rửa bằng 2M dung dịch arginin clorua (độ pH = 4,0) và gom phần chứa kháng thể. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5ml) được kết nối theo dãy), nhờ đó chất đệm được thay thế bằng chất đệm chứa 5mM natri phosphat, 50mM MES, và 20mM NaCl ở độ pH = 6,5. Hơn nữa, dung dịch kháng thể được cho vào thay thế chất đệm được áp dụng vào cột hydroxyapatit gồm (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., cột Bio-Scale CHT2-1 hydroxyapatit (thể tích: 2ml)) được làm cân bằng với chất đệm chứa 5mM NaPi, 50 mM MES, và 20mM NaCl ở độ pH = 6,5. Sau đó, tách rửa gradient nồng độ tuyến tính bằng natri clorua được thực hiện và gom phần chứa kháng thể. Phần này được áp dụng vào cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột khử muối HiTrap (thể tích: 5ml) được kết nối theo dãy), nhờ đó chất lỏng được thay thế bằng CBS (10mM chất đệm xitrat chứa 140mM natri clorua, độ pH = 6,0). Cuối cùng, cô đặc dung dịch thu được bằng cách sử dụng thiết bị lọc Centrifugal UF VIVASPIN 20 (trọng lượng phân tử phân đoạn: 30 K, Sartorius Co., Ltd., ở 4°C), và điều chỉnh nồng độ IgG đến 1,0mg/ml hoặc lớn hơn và dung dịch thu được theo cách này được sử dụng làm mẫu tinh chế.

11)-2-2 So sánh hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được cấy ghép dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 giữa kháng thể cB273 và conatumumab

1×10^7 tế bào của dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào các

ngày 6, 13, và 20 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 hoặc conatumumab được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 3, 10 hoặc 30 mg/kg ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.25. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 30 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 57,9% trong nhóm được dùng kháng thể cB273 ở 3mg/kg, 56,0% trong nhóm được dùng kháng thể cB273 ở 10mg/kg, 53,6% trong nhóm được dùng kháng thể cB273 ở 30mg/kg, 27,4% trong nhóm được dùng conatumumab ở 3mg/kg, 26,9% trong nhóm được dùng conatumumab ở 10mg/kg, và 20,3% trong nhóm được dùng conatumumab ở 30mg/kg.

11)-2-3 So sánh hoạt tính kháng khối u ở chuột trụi lông được cấy ghép dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H1975 giữa kháng thể cB273 và conatumumab

3×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H1975 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào các ngày 12, 19, và 26 sau khi cấy ghép, kháng thể cB273 hoặc conatumumab được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 3 hoặc 10mg/kg ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.26. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 32 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 71,5% trong nhóm được dùng kháng thể cB273 ở 3mg/kg, 73,3% trong nhóm được dùng kháng thể cB273 ở 10mg/kg, 13,5% trong nhóm được dùng conatumumab ở 3mg/kg, và 12,6% trong nhóm được dùng conatumumab ở 10mg/kg.

Ví dụ 12: Tác dụng kháng khối u In vivo của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK

12)-1 Hoạt tính kháng khối u của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK ở chuột

trụi lông được cấy ghép với dòng tế bào ung thư ruột kết của người COLO 205

2×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư ruột kết của người COLO 205 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào các ngày 8, 15, và 22 sau khi cấy ghép, kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK hoặc kháng thể cB273 được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 0,3 hoặc 3mg/kg ($n = 10$). Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trực lớn và trực nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.27. Sự thoái hóa hoàn toàn khối u được quan sát ở tất cả các chuột trong nhóm được dùng kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK ở 3mg/kg và nhóm được dùng kháng thể cB273 ở 0,3mg/kg. Hơn nữa, sự thoái hóa hoàn toàn khối u được quan sát ở 9 trong số 10 chuột trong nhóm được dùng kháng thể hB273_H2-1-NE/ hB273_L1-NK ở 0,3mg/kg, và 8 trong số 10 chuột trong nhóm được dùng kháng thể cB273 ở 3mg/kg. Ví dụ 13: Hoạt tính gây chết tế bào In vitro của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK đối với dòng tế bào ung thư của người

NCI-N87, KATO-III, và SNU-16 (mỗi trong số chúng là dòng tế bào ung thư dạ dày của người), Caki-1, ACHN, và 786-O (mỗi trong số chúng là dòng tế bào ung thư thận của người), Hep3B, SK-HEP-1, và HepG2 (C3A) (mỗi trong số chúng là dòng tế bào ung thư gan của người), và HT-1080 (mà là dòng tế bào sácôm xơ của người) mua được từ American Type Culture Collection (ATCC). GCIY (mà là dòng tế bào ung thư dạ dày của người) mua được từ RIKEN. HuH-7 (mà là dòng tế bào ung thư gan của người) mua được từ National Institute of Biomedical Innovation.

Các hoạt tính gây chết tế bào in vitro đối với các loại dòng tế bào khác nhau được xác định bằng phương pháp sau đây. Đối với dòng tế bào ung thư dạ dày, dòng tế bào ung thư thận và dòng tế bào sácôm xơ, tế bào được nuôi cấy phụ thích hợp được đếm số lượng bằng phương pháp nhuộm xanh trypan và sau đó được tạo thành ở 1×10^5 tế bào/ml trong môi trường chứa 10% huyết thanh bào thai bò (được sản

xuất bởi HyClone Laboratories, Inc.) (sau đây được gọi là “môi trường”). Trong môi trường này, kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK ở 20µg/ml và kháng thể thứ cấp (kháng thể dê kháng IgG người, được sản xuất bởi MP Biomedicals, LLC.) ở 40µg/ml được trộn lẫn. Sau đó, pha loãng hỗn hợp thu được với môi trường, nhờ đó dung dịch được tạo ra sao cho nồng độ kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK là 2000, 200, 20 hoặc 2ng/ml. Mỗi trong số các dung dịch thu được có nồng độ tương ứng được bổ sung vào vi đĩa 96 giếng trong suốt (được sản xuất bởi Corning Incorporated) ở 50µl/giếng (3 giếng/nhóm) và tạo hạt huyền phù tế bào ở 50µl/giếng (5×10^3 tế bào) (nồng độ cuối cùng của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK: 10000, 1000, 100, 10 hoặc 1ng/ml).

Đối với dòng tế bào ung thư gan của người, tế bào được nuôi cấy phụ thích hợp được đếm số lượng bằng phương pháp nhuộm xanh trypan và sau đó được tạo thành ở 4×10^4 tế bào/ml trong môi trường. Trong môi trường này, kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK ở 2µg/ml và kháng thể thứ cấp 4µg/ml được trộn lẫn. Sau đó, pha loãng hỗn hợp thu được bằng môi trường, nhờ đó dung dịch được tạo thành sao cho nồng độ của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK là 200, 20, 2, 0,2 hoặc 0,02ng/ml. Mỗi trong số các dung dịch thu được có nồng độ tương ứng được bổ sung vào vi đĩa 96 giếng đáy sạch màu đen (được sản xuất bởi Corning Incorporated) ở 50µl/giếng (2 giếng/nhóm) và tạo hạt huyền phù tế bào ở 50µl/giếng (2×10^3 tế bào) (nồng độ cuối cùng của kháng thể: 1000, 100, 10, 1, 0,1 hoặc 0,01 ng/ml).

Tế bào được nuôi cấy ở 37°C với sự có mặt của 5% CO₂ trong 72 giờ và lượng ATP trong mỗi giếng được xác định. Việc xác định lượng ATP được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng huỳnh quang luxiferaza (CellTiter-Glo, được sản xuất bởi Promega Corporation) theo quy trình kèm theo. Tức là, dung dịch thử nghiệm bao gồm hợp phần làm tan tế bào và hợp phần chất nền huỳnh quang được bổ sung vào đĩa ở 100µl/giếng, tiếp theo khuấy. Sau đó, huỳnh quang từ mỗi giếng

được xác định bằng huỳnh quang kế (được sản xuất bởi Berthold Technologies). Đối với dòng tế bào ung thư dạ dày, dòng tế bào ung thư thận và dòng tế bào sacôm xơ, dung dịch thử nghiệm với lượng 100µl/giếng được chuyển từ vi đĩa 96 giếng trong suốt vào vi đĩa 96 giếng màu trắng (được sản xuất bởi Corning Incorporated), và sau đó, xác định huỳnh quang.

Giếng mà trong đó môi trường và huyền phù tế bào được bổ sung vào được tạo thành làm giếng đối chứng âm tính, giếng mà trong đó chỉ có môi trường được bổ sung vào được tạo thành làm giếng nền, và khả năng sống của tế bào trong giếng thử nghiệm được tính toán theo công thức sau đây.

Khả năng sống của tế bào (%) = (Cường độ huỳnh quang của giếng thử nghiệm – Cường độ huỳnh quang trung bình của giếng nền) / (Cường độ huỳnh quang trung bình của giếng đối chứng âm tính – Cường độ huỳnh quang trung bình của giếng nền) x 100

Trong Fig.51, giá trị trung bình về khả năng sống của tế bào của mỗi dòng tế bào đối với các nồng độ tương ứng của kháng thể được sử dụng trong điều trị được thể hiện. Đối với dòng tế bào ung thư dạ dày, dòng tế bào ung thư thận và dòng tế bào sacôm xơ, sai số tiêu chuẩn được thể hiện bởi cột sai số. Kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK thể hiện hoạt tính gây chết tế bào đối với tất cả dòng tế bào được thử nghiệm ngoại trừ đối với 786-O.

Ví dụ 14: Xác định hoạt tính in vivo của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK kết hợp với chất hóa trị liệu

14)-1 Hoạt tính kháng khối u của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK kết hợp với 5-FU ở chuột trụi lông được cấy ghép với dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 và so sánh hoạt tính với conatumumab

1×10^7 tế bào của dòng tế bào ung thư ruột kết của người HCT-15 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông (CAnN.Cg-Foxnl^{nu}/CrJCrJ, mua được từ Charles River Laboratories Japan, Inc.).

Vào các ngày 7, 14, và 21 sau khi cấy ghép, kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK hoặc conatumumab được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 3mg/kg. 5-FU được dùng qua tĩnh mạch đuôi vào ngày 7 sau khi cấy ghép ở liều 160mg/kg. Thử nghiệm được thực hiện ở $n = 6$. Trục lớn và trục nhỏ của khối u được cấy ghép được xác định hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước đo số điện tử (được sản xuất bởi Mitutoyo Corporation), và thể tích khối u được tính toán theo công thức tính toán sau đây.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = 1/2 \times (\text{Trục nhỏ})^2 (\text{mm}) \times (\text{Trục lớn})^2 (\text{mm})$$

Các kết quả được thể hiện trong Fig.52. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 28 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 62% trong nhóm được dùng kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK, 27% trong nhóm được dùng conatumumab, 54% trong nhóm dùng 5-FU, 91% trong nhóm dùng kết hợp kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK và 5-FU, và 78% trong nhóm dùng kết hợp conatumumab và 5-FU. Tức là, tác dụng kết hợp của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK và 5-FU được quan sát và hơn nữa, hoạt tính kháng khối u được quan sát trong nhóm dùng kết hợp kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK và 5-FU lớn hơn trong nhóm dùng kết hợp conatumumab và 5-FU.

14)-2 Hoạt tính kháng khối u của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK kết hợp với paclitaxel ở chuột trụi lông được cấy ghép với dòng tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ của người NCI-H1975 và so sánh hoạt tính với conatumumab

3×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ của người NCI-H1975 (mua được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở vùng nách của chuột trụi lông. Vào ngày 11, 18, và 25 sau khi cấy ghép, kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK hoặc conatumumab được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi ở liều 3mg/kg. Paclitaxel được dùng cho chuột mang khối u qua tĩnh mạch đuôi vào các ngày 11, 12, 13, và 14 sau khi cấy ghép ở liều 6,25 mg/kg. Thử nghiệm được thực hiện ở $n = 6$. Theo cách tương tự như được mô tả trên đây, trục lớn và trục nhỏ

của khối u được cấy ghép được xác định và thể tích khối u được tính toán.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.53. Tốc độ ức chế phát triển khối u vào ngày 32 sau khi cấy ghép, mà là ngày cuối cùng của việc xác định, là 66% trong nhóm dùng kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK, 40% trong nhóm dùng conatumumab, 49% trong nhóm dùng paclitaxel, 91% trong nhóm dùng kết hợp kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK và paclitaxel, và 79% trong nhóm dùng kết hợp conatumumab và paclitaxel. Tức là, tác dụng kết hợp của kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK và paclitaxel quan sát được và hơn nữa, hoạt tính kháng khối u quan sát được trong nhóm dùng kết hợp kháng thể hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK và paclitaxel lớn hơn trong nhóm dùng kết hợp conatumumab và paclitaxel.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể có khả năng gắn kết với DR5, khác biệt ở chỗ:

trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi có CDRH1, CDRH2, và CDRH3 và CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 82, CDRH2 bao gồm một trong số các trình tự axit amin được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 89 và 83, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 84; và

trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi có CDRL1, CDRL2, và CDRL3, và CDRL1 bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 87, 85, 86, 88, và 79, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81, hoặc mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên.

2. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16.

3. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ, kháng thể này là kháng thể khảm.

4. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, chứa trình tự chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16.

5. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, kháng thể này được làm giống như của con người.

6. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, chứa:

(a) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau đây:

a1) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70;

a2) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 42;

a3) trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin được chọn từ a1) và a2);

a4) trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 99% với trình tự axit amin được chọn từ a1) và a2); và

a5) trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài gốc axit amin trong một trong số các trình tự axit amin được chọn từ a1) và a2); và

(b) trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau đây:

b1) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62;

b2) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 52;

b3) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 58;

b4) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66;

b5) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28;

b6) trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 95% với một trong số các trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b5);

b7) trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 99% với một trong số các

trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b5); và

b8) trình tự axit amin bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài gốc axit amin trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b5).

7. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo điểm 6, khác biệt ở chỗ, chứa: i) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62; ii) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 52; iii) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 58; iv) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 42 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28; v) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 134 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66; vi) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62; vii) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các

gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 52; viii) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 58; ix) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 42 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28; hoặc x) trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 70 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 239 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66.

8. Mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó mảnh này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, F(ab')₂, Fab' và Fv.

9. Dược phẩm, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này bao gồm ít nhất một trong số các kháng thể hoặc mảnh chức năng của các kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo các điểm từ 1 đến 8.

10. Dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, khác biệt ở chỗ, bao gồm ít nhất một kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên theo các điểm từ 1 đến 8 và ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm paclitaxel, carboplatin, CPT-11 và vinblastin.

11. Polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 4, 6 hoặc 7.

12. Polynucleotit theo điểm 11, khác biệt ở chỗ, chứa: i) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 19 và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15; hoặc ii) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58

đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 19 và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15.

13. Polynucleotit theo điểm 11, khác biệt ở chỗ, chứa:

(a) polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nucleotit sau đây:

a1) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69;

a2) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 41;

a3) trình tự nucleotit của polynucleotit mà lai với polynucleotit bao gồm phân bổ sung trình tự nucleotit với trình tự nucleotit được chọn từ a1) và a2) trong các điều kiện nghiêm ngặt; và

a4) trình tự nucleotit bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài nucleotit trong trình tự nucleotit được chọn từ a1) và a2); và

(b) polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nucleotit sau đây:

b1) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61;

b2) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 51;

b3) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 57;

b4) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 65;

b5) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27;

b6) trình tự nucleotit của polynucleotit mà lai với polynucleotit bao gồm phân bổ sung trình tự nucleotit với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được

chọn từ b1) đến b5) trong các điều kiện nghiêm ngặt; và

b7) trình tự nucleotit bao gồm thay thế, bớt hoặc thêm từ một đến vài nucleotit trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được chọn từ b1) đến b5).

14. Polynucleotit theo điểm 13, khác biệt ở chỗ, chứa polynucleotit bao gồm: i) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61; ii) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 51; iii) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 57; iv) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 41, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27; v) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 402 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 65; vi) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61; vii) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 51; viii) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit

được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 57; ix) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 41, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27; hoặc x) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1413 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 69, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 717 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 65.

15. Vector bao gồm polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit theo các điểm từ 11 đến 14.

16. Tế bào chủ được biến nạp bao gồm polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit theo các điểm từ 11 đến 14, hoặc vector theo điểm 15.

17. Phương pháp sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 4, 6 hoặc 7, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 16 và tinh chế kháng thể này từ sản phẩm nuôi cấy thu được.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Kháng thể kháng thụ thể gây chết 5 (DR5) và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> DSPCT-FP1141

<150> JP 2010-243549

<151> 2010-10-29

<160> 89

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

Asp	Gln	Ala	Ser
			20

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MH258E1F1 mỗi

<400> 3

aagaattcat gggatggagc tgtatc

26

<210> 4

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> G1EVR1 mỗi

 <400> 4
 aagatatctt atttaccagg agagtgggag ag 32

 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MK19EIF1 mỗi

 <400> 5
 aagaattcat gaagttgcct gttagg 26

 <210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> KEVR1 mỗi

 <400> 6
 aagatatctt aacactcatt cctgttgaag ct 32

 <210> 7
 <211> 1395
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1395)

 <400> 7
 atg gga tgg agc tgt atc ttt ctc ttt ctc ctg tca gta act gta ggt 48
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Val Gly
 1 5 10 15

 gtg ttc tct gag gtt cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96
 Val Phe Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

 cct ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttt 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

 att ggc tac ttt atg aac tgg atg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192
 Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

50		55		60	
gag tgg att gga cgt ttt aat cca tac aat ggt gat act ttc tac aac	240				
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn					
65		70		75	80
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tct acc	288				
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr					
		85		90	95
aca gcc cac atg gag ctc ctg agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc	336				
Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val					
		100		105	110
tat ttt tgt gga aga tcg gcg tat tac ttc gat agt ggg ggc tac ttt	384				
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe					
		115		120	125
gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gcc aaa acg	432				
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr					
		130		135	140
aca ccc cca tct gtc tat cca ctg gcc cct gga tct gct gcc caa act	480				
Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr					
		145		150	155
aac tcc atg gtg acc ctg gga tgc ctg gtc aag ggc tat ttc cct gag	528				
Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu					
		165		170	175
cca gtg aca gtg acc tgg aac tct gga tcc ctg tcc agc ggt gtg cac	576				
Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His					
		180		185	190
acc ttc cca gct gtc ctg cag tct gac ctc tac act ctg agc agc tca	624				
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser					
		195		200	205
gtg act gtc ccc tcc agc acc tgg ccc agc gag acc gtc acc tgc aac	672				
Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn					
		210		215	220
gtt gcc cac ccg gcc agc agc acc aag gtg gac aag aaa att gtg ccc	720				
Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro					
		225		230	235
agg gat tgt ggt tgt aag cct tgc ata tgt aca gtc cca gaa gta tca	768				
Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser					
		245		250	255
tct gtc ttc atc ttc ccc cca aag ccc aag gat gtg ctc acc att act	816				
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr					
		260		265	270
ctg act cct aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac atc agc aag gat gat	864				
Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp					
		275		280	285

ccc gag gtc cag ttc agc tgg ttt gta gat gat gtg gag gtg cac aca Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr 290 295 300	912
gct cag acg caa ccc cgg gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser 305 310 315 320	960
gtc agt gaa ctt ccc atc atg cac cag gac tgg ctc aat ggc aag gag Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 325 330 335	1008
ttc aaa tgc agg gtc aac agt gca gct ttc cct gcc ccc atc gag aaa Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys 340 345 350	1056
acc atc tcc aaa acc aaa ggc aga ccg aag gct cca cag gtg tac acc Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr 355 360 365	1104
att cca cct ccc aag gag cag atg gcc aag gat aaa gtc agt ctg acc Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr 370 375 380	1152
tgc atg ata aca gac ttc ttc cct gaa gac att act gtg gag tgg cag Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln 385 390 395 400	1200
tgg aat ggg cag cca gcg gag aac tac aag aac act cag ccc atc atg Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met 405 410 415	1248
gac aca gat ggc tct tac ttc gtc tac agc aag ctc aat gtg cag aag Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys 420 425 430	1296
agc aac tgg gag gca gga aat act ttc acc tgc tct gtg tta cat gag Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu 435 440 445	1344
ggc ctg cac aac cac cat act gag aag agc ctc tcc cac tct cct ggt Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly 450 455 460	1392
aaa Lys 465	1395
<210> 8	
<211> 465	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	
<400> 8	

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

225		230		235		240
Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser						
		245		250		255
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr						
		260		265		270
Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp						
		275		280		285
Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr						
		290		295		300
Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser						
		305		310		315
Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu						
		325		330		335
Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys						
		340		345		350
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr						
		355		360		365
Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr						
		370		375		380
Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln						
		385		390		395
Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met						
		405		410		415
Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys						
		420		425		430
Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu						
		435		440		445
Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly						
		450		455		460

Lys
465

<210> 9
<211> 714
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(714)

<400> 9
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

gta cac agt aat gga aac acc tat cta cat tgg tac ctg cag aag cca 192
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat ttc tgc 336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys
100 105 110

tct caa agt aca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg 384
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

gaa atc aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca 432
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
130 135 140

tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg 480
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
145 150 155 160

aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat ggc 528
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175

agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act gat cag gac agc 576
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190

aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc acg ttg acc aag gac 624
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205

gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt gag gcc act cac aag aca 672
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220

tca act tca ccc att gtc aag agc ttc aac agg aat gag tgt 714
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 10
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

115

120

125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EFF1 mỗi

<400> 11
 ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagc

28

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EfsmaR mỗi

<400> 12
 aaacccggga gcttttttgca aaagcctagg

30

<210> 13
 <211> 1704

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của peptit tín hiệu, vùng Fc và tín hiệu bổ sung poly A của chuỗi kappa của người

<400> 13

```

ggtagcaccg  aagctgggta  ggtaagcttg  ctacgcccac  catgggtgctg  cagacccagg      60
tggttcattct  cctgctgctg  tggatctccg  gcgcataatg  cgatatcgtg  atgattaaac     120
gtacgggtggc  cgccccctcc  gtgttcattct  tccccccctc  cgacgagcag  ctgaagtccg     180
gcaccgcctc  cgtgggtgtg  ctgctgaata  acttctaccc  cagagaggcc  aaggtgcagt     240
ggaaggtgga  caacgccttg  cagtccggga  actcccagga  gagcgtgacc  gagcaggaca     300
gcaaggacag  cacctacagc  ctgagcagca  ccctgaccct  gagcaaagcc  gactacgaga     360
agcacaaggt  gtacgcctgc  gaggtgaccc  accagggcct  gagctcccc  gtcaccaaga     420
gcttcaacag  ggggggagtgt  taggggccc  tttaaacggg  tggcatccct  gtgaccctc     480
cccagtgcct  ctcttgccc  tggaaagttg  cactccagt  cccaccagcc  ttgtcctaata     540
aaaattaagt  tgcattcat  tgtctgacta  ggtgtccttc  tataatatta  tggggtggag     600
gggggtggta  tggagcaagg  ggcaagttgg  gaagacaacc  ttaggggcct  gcggggtcta     660
ttgggaacca  agctggagtg  cagtggcaca  atcttggtc  actgcaatct  ccgcctcctg     720
ggttcaagcg  attctcctgc  ctacgcctcc  cgagttgttg  ggattccagg  catgcatgac     780
caggctcacc  taatTTTTGT  TTTTTTGGTA  gagacgggg  ttcaccatat  tggccaggct     840
gggtctccaa  ctctaattct  aggtgatcta  cccaccttg  cctcccaa  tgctgggatt     900
acaggcgtga  accactgctc  cagcgcctc  gtagcggcg  attaagcgcg  gcgggtgtgg     960
tggttacgcg  cagcgtgacc  gctacattg  ccagcgcct  agcggccgct  ctttcgctt    1020
tcttcccttc  ctttctcgcc  acgttcgcc  gctttcccc  tcaagctcta  aatcgggggc    1080
tccctttagg  gttccgattt  agtgctttac  ggcacctga  ccccaaaaa  cttgattagg    1140
gtgatgggtt  acgtagtggg  ccacgcccct  gatagacggt  ttttcgccct  ttgacgttg     1200
agtccacgtt  cttaaatagt  ggactcttgt  tccaaactgg  aacaacactc  aaccctatct    1260
cgggtctatt  ttttgattta  taagggattt  tgccgatttc  ggcctattgg  ttaaaaaatg    1320
agctgattta  acaaaaattt  aacgcgaatt  aattctgtgg  aatgtgtgtc  agttaggggtg    1380
tggaaagtcc  ccaggctccc  cagcaggcag  aagtatgcaa  agcatgcac  tcaattagtc     1440
agcaaccagg  tgtggaaagt  cccaggctc  cccagcaggc  agaagtatgc  aaagcatgca     1500

```

tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc 1560
 gccagttcc gccatttctc cgcgccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc 1620
 cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 1680
 aggcttttgc aaaaagctcc cggg 1704

<210> 14
 <211> 1120
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của peptit tín hiệu và vùng Fc của chuỗi IgG1 của người

<400> 14
 tgctagcgcc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg 60
 ggtgctgagc caggtgcaat tgtgcaggcg gttagctcag cctccaccaa gggcccaagc 120
 gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc 180
 ctggtcaagg actacttccc cgaaccctg accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc 240
 agcggcgtgc acaccttccc cgctgtcctg cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 300
 gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 360
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 420
 acatgcccac cctgcccagc acctgaactc ctggggggac cctcagtctt cctcttcccc 480
 ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 540
 gacgtgagcc acgaagacct tgaggtaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 600
 cataatgcca agacaaagcc cggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 660
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg ccagccccgg 780
 gaaccacagg tgtacaccct gcccctatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 900
 ggccagcccc agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960
 ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcagggcaa cgtcttctca 1020
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacc agaagagcct ctccctgtct 1080
 cccggcaaat gagatatcgg gcccgtttaa acgggtggca 1120

<210> 15
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của B273 khảm

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(717)

<400> 15
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

ggc gca tat ggc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc 144
 Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

ctt gta cac agt aat gga aac acc tat cta cat tgg tac ctg cag aag 192
 Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat ttc 336
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe
 100 105 110

tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag 384
 Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

ctg gaa atc aaa cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc 432
 Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg 480
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac 528

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac 576
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa 624
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 717
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

 <210> 16
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

 <400> 16

 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

 Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

 Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

 Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> B273LF mỗi

<400> 17
 aaacatatgg cgatgttgtg atgacccaaa ctccactctc c

41

<210> 18
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> B273LR mỗi

<400> 18
 aaacgtacgt ttgatttcca gcttggtgcc tccaccgaac g

41

<210> 19
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của B273 khám

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 19
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 gtg ctg agc gag gtt cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 cct ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttt 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 att ggc tac ttt atg aac tgg atg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192
 Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60
 gag tgg att gga cgt ttt aat cca tac aat ggt gat act ttc tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80
 cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tct acc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
 85 90 95
 aca gcc cac atg gag ctc ctg agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
 Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 tat ttt tgt gga aga tcg gcg tat tac ttc gat agt ggg ggc tac ttt 384
 Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125
 gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc agc tca gcc tcc acc 432
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct 480
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa 528
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190	576
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205	624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220	672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240	720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255	768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270	816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285	864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300	912
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 305 310 315 320	960
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 325 330 335	1008
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 340 345 350	1056
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 355 360 365	1104
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys 370 375 380	1152
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 385 390 395 400	1200

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1296
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 20
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
 85 90 95

Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 21
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> B273HF mỗi

<400> 21
 aaagctgagc gaggttcagc tgcagcagtc tggacctgag c

41

<210> 22
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> B273HR mỗi

<400> 22
aaagctgagc tgactgtgag agtgggtgcct tggccccagt ag

42

<210> 23
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro
1 5 10 15

Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His
20 25 30

His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln
35 40 45

Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr
50 55 60

Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg
65 70 75 80

Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser
85 90 95

Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val
100 105 110

Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys
115 120 125

Glu Ser
130

<210> 24
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DR5 Ndefw mỗi

<400> 24
gtggcatatg gctctgatca cccaacaa

28

<210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DR5 Xhorv mỗi

<400> 25
 cgcctcgagt gattctttgt ggacaca

27

<210> 26
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> rsDR5

<400> 26

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

Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly
 20 25 30

His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly
 35 40 45

Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys
 50 55 60

Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr
 65 70 75 80

Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp
 85 90 95

Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met
 100 105 110

Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His
 115 120 125

Lys Glu Ser Leu Glu His His His His His His

130

135

<210> 27
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_L1

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(717)

<400> 27
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30
 gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 ctg gtc cat agc aat ggg aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa 192
 Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60
 cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80
 agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat 336
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa 384
 Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125
 gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc 432
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg 480
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac 528
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac 576
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa 624
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 717
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 28
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 28

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 29
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_L2

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(717)

<400> 29
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 ggc gca tat ggc gac gtc gtc atg aca cag aca cct ctg agc ctg ccc 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30
 gtg tct ctg ggc gaa ccc gcc agt att tct tgt agg tca tct cag tct 144

Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser		
		35					40					45					
ctg	gtg	cac	agt	aac	gga	aac	aca	tat	ctc	cat	tgg	tac	ctg	cag	aag		192
Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys		
	50					55					60						
cca	ggt	cag	tcc	cca	aag	ctc	ctg	atc	tat	aag	gtg	agc	aac	aga	ttc		240
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe		
65					70					75					80		
tcc	gga	gtg	cct	gat	cga	ttc	agc	ggg	agt	ggt	tca	ggg	acc	gac	ttc		288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe		
				85					90					95			
acc	ttg	aag	att	agc	cgg	gtc	gag	gcc	gag	gat	gtt	gga	gtg	tat	ttc		336
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe		
			100					105					110				
tgt	agc	cag	agt	aca	cac	gtg	ccc	tgg	acc	ttc	gga	cct	ggg	act	aaa		384
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys		
		115					120					125					
gtc	gag	att	aaa	cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc		432
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro		
	130						135					140					
ccc	tcc	gac	gag	cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg		480
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu		
145					150					155					160		
ctg	aat	aac	ttc	tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac		528
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp		
				165					170					175			
aac	gcc	ctg	cag	tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac		576
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp		
			180					185					190				
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa		624
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys		
		195					200					205					
gcc	gac	tac	gag	aag	cac	aag	gtg	tac	gcc	tgc	gag	gtg	acc	cac	cag		672
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln		
	210					215					220						
ggc	ctg	agc	tcc	ccc	gtc	acc	aag	agc	ttc	aac	agg	ggg	gag	tgt			717
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			
225					230					235							

<210> 30
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 30

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

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

Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 31
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_L3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(717)

<400> 31
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 ggc gca tat ggc gac gtg gtg atg acg cag act ccg ctg tca ctg ccc 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30
 gta tct ctg gga gag cct gcc agc atc agc tgc agg agc tct caa tca 144
 Val Ser Leu Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 ctg gtg cac tct aac ggt aat acc tac ctc cac tgg tat ctc cag aag 192
 Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60
 cca gga caa tcc cca aag ttg ctc ata tat aaa gtg tcc aac cgg ttc 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80
 tca gga gtc cct gac cgg ttt agc ggt agt ggc tct ggt aca gat ttc 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 acc ctg aaa ata tca agg gtt gaa gcg gaa gac gta gga gtg tat ttt 336
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
 100 105 110
 tgc agc cag agc acc cat gtc ccc tgg aca ttt ggg ggc ggc acc aag 384
 Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 gtc gaa atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc 432
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg 480
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac 528
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac 576
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa 624
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 717
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 32
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 32

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

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

Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85

90

95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 33
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H1

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 33
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

48

gtg ctg agc caa gtt cag ctc gtg cag tcc ggc gcg gag gtt aag aaa	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cca ggc gca tcc gtt aaa gtg tca tgt aag gcc agc ggg tac tcc ttt	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tac ttt atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggt atg ggc ctg	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg atg gga cgg ttt aat cca tat aat ggc gat act ttt tac aac	240
Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aaa ttt aaa gga agg gtc act ctc aca gtg gat aaa agc act agt	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
acg gct tac atg gaa ctg tcc tcc ctc aga tca gaa gat act gcc gtc	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac tac tgc gcc cga agt gct tac tat ttc gac agc ggg ggc tac ttt	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gat tat tgg ggc cag ggg acc ctg gta act gtg agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768

Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
				245					250					255			
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccc	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	816	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
			260					265					270				
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	864	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
		275					280					285					
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	912	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
	290					295					300						
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac	960	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
305					310					315					320		
aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	1008	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
				325					330					335			
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	1056	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
			340					345					350				
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg	1104	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
		355					360					365					
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	1152	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
	370					375					380						
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	1200	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
385					390					395					400		
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	1248	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
			405					410						415			
acc	acc	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	1296	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
			420					425					430				
aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca	1344	
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
		435					440					445					
tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	cag	aag	agc	1392	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		
	450					455					460						
ctc	tcc	ctg	tct	ccc	ggc	aaa										1413	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											

465

470

<210> 34
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 34

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

405

410

415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 35
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H2

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 35
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 gtg ctg agc cag gtc cag ctg gtg cag agt gga gcc gag gta aaa aaa 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 cca ggg gct agt gtc aag gtc tcc tgt aag gca tct ggt tac tct ttt 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 ata gga tac ttc atg aac tgg atg aag cag tct ccc ggt atg tct ctg 192
 Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60
 gag tgg att ggc aga ttc aac ccc tac aac ggg gac act ttt tat aat 240
 Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80
 cag aag ttc aaa ggg aaa gcc act ctg acc gtg gac aag tca act tcc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

aca gca tac atg gaa ttg tcc tca ctg agg tcc gaa gat acc gcc gtg Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110	336
tac ttc tgc gct cgg agt gct tat tat ttc gat agc gga ggg tat ttt Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe 115 120 125	384
gac tat tgg ggg caa ggg acc ctt gta acc gtg agc tca gcc tcc acc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140	432
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160	480
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175	528
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190	576
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205	624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220	672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240	720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255	768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270	816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285	864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300	912
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 305 310 315 320	960
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008

Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
				325					330					335			
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	1056	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
			340					345					350				
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg	1104	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
			355					360					365				
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	1152	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
			370				375						380				
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	1200	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
385						390				395					400		
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	1248	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
				405					410						415		
acc	acc	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	1296	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
				420					425					430			
aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca	1344	
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
			435				440						445				
tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	cag	aag	agc	1392	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		
			450				455					460					
ctc	tcc	ctg	tct	ccc	ggc	aaa										1413	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
465						470											

<210> 36
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	

Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 37

<211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 37
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtg ctg agc gaa gtg cag ctc gtg caa agc ggc gct gaa gtg aaa aaa 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

cca gga gcc tca gtc aaa gtg tcc tgt aag gcc tcc ggg tat agc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

atc ggc tat ttt atg aac tgg atg aag cag agc ccg ggc aaa agc ctc 192
 Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

gaa tgg atc ggg aga ttc aat cca tac aat ggt gac acc ttt tac aat 240
 Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

cag aaa ttc aaa ggc aag gcc acg ctg act gta gac aaa tcc acc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

aca gcc cac atg gaa ttg tct tcc ctg agg tct gag gat acc gcg gtg 336
 Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

tac ttt tgt ggc cga agt gcg tat tat ttc gat tca ggc ggg tac ttc 384
 Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

gat tac tgg ggt cag ggg acg ctc gtc acc gta agc tca gcc tcc acc 432
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct 480
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa 528
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

ccc	gtg	acc	gtg	agc	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	576
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
			180					185					190			
acc	ttc	ccc	gct	gtc	ctg	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	624
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
		195					200					205				
gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	672
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
	210					215					220					
aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag	720
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	
225					230					235					240	
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccc	tgc	cca	gca	cct	768
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				245					250					255		
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccc	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	816
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
			260					265					270			
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	864
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
		275					280					285				
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	912
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
	290					295					300					
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac	960
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
305					310					315					320	
aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	1008
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				325					330					335		
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	1056
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
			340					345					350			
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg	1104
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
		355					360					365				
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	1152
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
	370					375					380					
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	1200
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
385					390					395					400	
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	1248


```

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
      405                      410                      415

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc      1296
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
      420                      425                      430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca      1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
      435                      440                      445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc      1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
      450                      455                      460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                      470      1413

<210> 38
<211> 471
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1      5      10      15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
      20      25      30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
      35      40      45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu
50      55      60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65      70      75      80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
      85      90      95

Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100      105      110

```

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 39
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H1-1

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 39
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

cct ggc gct tct gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe 35 40 45	144
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg cgg cag gcc cct ggc atg gga ctg Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu 50 55 60	192
gaa tgg atg ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn 65 70 75 80	240
cag aaa ttc aag ggc aga gtg acc ctg acc gtg gac aag agc acc agc Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser 85 90 95	288
acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110	336
tat ttc tgc ggc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe 115 120 125	384
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140	432
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160	480
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175	528
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190	576
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205	624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220	672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240	720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255	768

gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
325 330 335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
340 345 350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg	1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
355 360 365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag	1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
370 375 380	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac	1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
385 390 395 400	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag	1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
405 410 415	
acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc	1296
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
420 425 430	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca	1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	
435 440 445	
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc	1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
450 455 460	
ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa	1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
465 470	

<210> 40
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 41
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H2-1

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 41
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 gtg ctg agc gag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg 192
 Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60
 gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80
 cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

tac ttc tgc gcc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe 115 120 125	384
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140	432
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160	480
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175	528
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190	576
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205	624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220	672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240	720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255	768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270	816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285	864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300	912
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 305 310 315 320	960
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 325 330 335	1008

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
340 345 350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg	1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
355 360 365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag	1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
370 375 380	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac	1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
385 390 395 400	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag	1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
405 410 415	
acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc	1296
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
420 425 430	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca	1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	
435 440 445	
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc	1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
450 455 460	
ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa	1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
465 470	

<210> 42
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 42

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 43

<211> 1413

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H2-2

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1413)

<400> 43

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu	
50 55 60	
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
acc gcc cac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg	336
Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac ttc tgc gcc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	

acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205	624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220	672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240	720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255	768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270	816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285	864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300	912
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 305 310 315 320	960
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 325 330 335	1008
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 340 345 350	1056
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 355 360 365	1104
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys 370 375 380	1152
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 385 390 395 400	1200
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 405 410 415	1248

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1296
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 44
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 44

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 45
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H2-3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 45
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtg ctg agc gag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

35	40	45	
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu 50 55 60			192
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn 65 70 75 80			240
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser 85 90 95			288
acc gcc cac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110			336
tac ttc tgc gcc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe 115 120 125			384
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140			432
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160			480
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175			528
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190			576
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205			624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220			672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240			720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255			768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270			816

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
325 330 335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
340 345 350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg	1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
355 360 365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag	1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
370 375 380	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac	1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
385 390 395 400	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag	1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
405 410 415	
acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc	1296
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
420 425 430	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca	1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	
435 440 445	
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc	1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
450 455 460	
ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa	1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
465 470	

<210> 46
 <211> 471
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 46

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 47
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H2-4

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 47
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg 192
 Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60
 gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80
 cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 tac ttc tgc ggc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc 384
 Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe

115	120	125	
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140			432
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160			480
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175			528
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190			576
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205			624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220			672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240			720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255			768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270			816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285			864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300			912
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 305 310 315 320			960
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 325 330 335			1008
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 340 345 350			1056

```

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg      1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
      355                      360                      365

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag      1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
      370                      375                      380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac      1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
      385                      390                      395                      400

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag      1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
      405                      410                      415

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc      1296
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
      420                      425                      430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca      1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
      435                      440                      445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc      1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
      450                      455                      460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa      1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      465                      470

<210> 48
<211> 471
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 48

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1          5          10          15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
      20          25          30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
      35          40          45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu

```


50

55

60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 49

<211> 1413

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H2-5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1413)

<400> 49

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc aag agc ctg	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu	
50 55 60	
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac ttc tgc ggc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc	384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	

195	200	205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220			672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240			720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255			768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270			816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285			864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300			912
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 305 310 315 320			960
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 325 330 335			1008
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 340 345 350			1056
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 355 360 365			1104
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys 370 375 380			1152
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 385 390 395 400			1200
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 405 410 415			1248
acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 420 425 430			1296

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 50
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 50

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130

135

140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 51
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_L1-NE

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(717)

<400> 51
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30
 gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 ctg gtc cat agc aat gag aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa 192

Leu	Val	His	Ser	Asn	Glu	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys		
50						55					60						
cca	ggg	cag	tcc	cca	cag	ctc	ttg	atc	tac	aag	gtg	tcc	aat	cgg	ttc	240	
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe		
65					70					75					80		
agt	ggg	gtg	cct	gac	cgc	ttc	tcc	gga	agt	ggc	tcc	ggg	aca	gat	ttc	288	
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe		
				85					90					95			
act	ctt	aag	att	tca	aga	gtg	gag	gca	gaa	gac	gtt	gga	gtc	tat	tat	336	
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr		
			100					105					110				
tgc	tca	cag	agc	aca	cat	gtc	ccc	tgg	act	ttc	ggg	ccc	ggc	aca	aaa	384	
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys		
		115					120					125					
gtc	gag	atc	aag	cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc	432	
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro		
	130					135					140						
ccc	tcc	gac	gag	cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg	480	
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu		
145					150					155					160		
ctg	aat	aac	ttc	tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac	528	
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp		
				165					170					175			
aac	gcc	ctg	cag	tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac	576	
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp		
			180					185					190				
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa	624	
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys		
		195					200					205					
gcc	gac	tac	gag	aag	cac	aag	gtg	tac	gcc	tgc	gag	gtg	acc	cac	cag	672	
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln		
	210					215					220						
ggc	ctg	agc	tcc	ccc	gtc	acc	aag	agc	ttc	aac	agg	ggg	gag	tgt		717	
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			
225					230					235							

<210> 52
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 52

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

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 53
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-F1 mỗi

<400> 53
 aggtaagctt gctagcgcca ccatggtgct gc 32

<210> 54
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-NE-R2 mỗi

<400> 54
 ccaatgcagg taagtgttct cattgctatg gaccagtgac tg 42

<210> 55
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-NE-F2 mỗi

<400> 55
 cagtcactgg tccatagcaa tgagaacact tacctgcatt gg 42

<210> 56
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-R1 mỗi

<400> 56
 ggatgccacc cgttttaaacg ggcccctaac ac 32

<210> 57
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_L1-NF

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(717)

<400> 57

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct	96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca	144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctg gtc cat agc aat ttc aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa	192
Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
65 70 75 80	
agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
100 105 110	
tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
115 120 125	
gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
145 150 155 160	
ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
165 170 175	
aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
180 185 190	

agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa 624
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 717
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 58
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 58

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 59
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> L-NF-R2 mỗi

<400> 59
ccaatgcagg taagtgttga aattgctatg gaccagtgac tg

42

<210> 60
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> L-NF-F2 mỗi

<400> 60
cagtcactgg tccatagcaa tttcaacact tacctgcatt gg

42

<210> 61
<211> 717
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_L1-NK

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(717)

<400> 61

atg	gtg	ctg	cag	acc	cag	gtg	ttc	atc	tcc	ctg	ctg	ctg	tgg	atc	tcc	48
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	
1				5					10					15		

ggc	gca	tat	ggc	gac	atc	gta	atg	acc	cag	tct	ccg	ctg	agt	ctt	cct	96
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	
			20					25					30			

gtg	act	cca	ggg	gag	ccc	gca	agc	atc	tct	tgt	cgc	agc	agt	cag	tca	144
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	
		35					40					45				

ctg	gtc	cat	agc	aat	aag	aac	act	tac	ctg	cat	tgg	tac	ctc	caa	aaa	192
Leu	Val	His	Ser	Asn	Lys	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	
	50					55					60					

cca	ggg	cag	tcc	cca	cag	ctc	ttg	atc	tac	aag	gtg	tcc	aat	cgg	ttc	240
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	
65					70					75					80	

agt	ggg	gtg	cct	gac	cgc	ttc	tcc	gga	agt	ggc	tcc	ggg	aca	gat	ttc	288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
				85				90						95		

act	ctt	aag	att	tca	aga	gtg	gag	gca	gaa	gac	ggt	gga	gtc	tat	tat	336
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	
			100					105					110			

tgc	tca	cag	agc	aca	cat	gtc	ccc	tgg	act	ttc	ggg	ccc	ggc	aca	aaa	384
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	
		115					120					125				

gtc	gag	atc	aag	cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc	432
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	
	130					135					140					

ccc	tcc	gac	gag	cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg	480
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	
145					150					155					160	

ctg	aat	aac	ttc	tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac	528
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	
				165					170					175		

aac	gcc	ctg	cag	tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac	576
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
			180					185					190			

agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa	624
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	

195	200	205	
gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag			672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln			
210	215	220	
ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt			717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	
<210>	62		
<211>	239		
<212>	PRT		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Cấu trúc tổng hợp		
<400>	62		
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser			
1	5	10	15
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro			
	20	25	30
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser			
	35	40	45
Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys			
	50	55	60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe			
65	70	75	80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
	85	90	95
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr			
	100	105	110
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys			
	115	120	125
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
	130	135	140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 63
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-NK-R2 mỗi

<400> 63
 ccaatgcagg taagtgttct tattgctatg gaccagtgac tg 42

<210> 64
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-NK-F2 mỗi

<400> 64
 cagtcactgg tccatagcaa taagaacact tacctgcatt gg 42

<210> 65
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_L1-NL

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(717)

<400> 65

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct	96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca	144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctg gtc cat agc aat ctg aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa	192
Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
65 70 75 80	
agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
100 105 110	
tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
115 120 125	
gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
145 150 155 160	
ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
165 170 175	
aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
180 185 190	
agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
195 200 205	

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 717
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 66
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 66

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 67
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-NL-R2 mỗi

<400> 67
 ccaatgcagg taagtgttca gattgctatg gaccagtgac tg

42

<210> 68
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> L-NL-F2 mỗi

<400> 68
 cagtcaactgg tccatagcaa tctgaacact tacctgcatt gg

42

<210> 69
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa hB273_H2-1-NE

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(1413)

<400> 69

atg	aaa	cac	ctg	tgg	ttc	ttc	ctc	ctg	ctg	gtg	gca	gct	ccc	aga	tgg	48
Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	
1			5					10					15			
gtg	ctg	agc	gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggc	gcc	gaa	gtg	aag	aaa	96
Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	
			20					25					30			
cct	gga	gcc	agc	gtg	aag	gtg	tcc	tgc	aag	gcc	agc	ggc	tac	agc	ttc	144
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	
		35					40					45				
atc	ggc	tac	ttc	atg	aac	tgg	atg	aag	cag	agc	ccc	ggc	atg	agc	ctg	192
Ile	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Met	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Met	Ser	Leu	
	50					55					60					
gaa	tgg	atc	ggc	cgg	ttc	aac	ccc	tac	aac	gag	gac	acc	ttc	tac	aac	240
Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Phe	Asn	Pro	Tyr	Asn	Glu	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	
65					70				75						80	
cag	aag	ttc	aag	gga	aag	gcc	acc	ctg	aca	gtg	gac	aag	agc	acc	agc	288
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	
				85					90					95		
acc	gcc	tac	atg	gaa	ctg	agc	agc	ctg	cgg	agc	gag	gat	acc	gcc	gtg	336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
			100					105					110			
tac	ttc	tgc	gcc	aga	agc	gcc	tac	tac	ttc	gac	agc	ggc	ggc	tac	ttc	384
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Gly	Gly	Tyr	Phe	
		115					120					125				
gac	tac	tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtg	aca	gtg	agc	tca	gcc	tcc	acc	432
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	
	130					135					140					
aag	ggc	cca	agc	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	480
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
145					150				155					160		
ggc	ggc	aca	gcc	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	528
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
				165				170						175		
ccc	gtg	acc	gtg	agc	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	576
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
			180					185					190			
acc	ttc	ccc	gct	gtc	ctg	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	624
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
		195					200					205				
gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	672
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	

210	215	220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240			720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255			768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270			816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285			864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300			912
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 305 310 315 320			960
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 325 330 335			1008
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 340 345 350			1056
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 355 360 365			1104
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys 370 375 380			1152
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 385 390 395 400			1200
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 405 410 415			1248
acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 420 425 430			1296
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 435 440 445			1344

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 70
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 70

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Glu Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

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

145		150		155		160
Gly Gly Thr Ala	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu				
	165		170			175
Pro Val Thr Val	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His					
	180		185			190
Thr Phe Pro Ala Val	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser					
	195		200			205
Val Val Thr Val Pro	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys					
	210		215			220
Asn Val Asn His Lys	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu					
	225		230			235
Pro Lys Ser Cys Asp	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro					
	245		250			255
Glu Leu Leu Gly Gly	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys					
	260		265			270
Asp Thr Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val					
	275		280			285
Asp Val Ser His Glu	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp					
	290		295			300
Gly Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr					
	305		310			315
Asn Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp					
	325		330			335
Trp Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu					
	340		345			350
Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg					
	355		360			365
Glu Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys					
	370		375			380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 71
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-F1 mỗi

<400> 71
 aggtaagctt gctagcgcca ccatgaaaca cc

32

<210> 72
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-NE-R2 mỗi

<400> 72
 ctggtttagt aaggtgtcct cggttaggg gttgaaccgg cc

42

<210> 73
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H-NE-F2 mỗi

<400> 73
ggccggttca acccctacaa cgaggacacc ttctacaacc ag 42

<210> 74
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> H-R1 mỗi

<400> 74
ggatgccacc cgttttaaacg ggcccgatat ctc 33

<210> 75
<211> 705
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ conatumumab

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(705)

<400> 75
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15
ggc gca tat ggc gaa atc gtg ttg aca cag agt ccc ggc act ctt agc 96
Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30
ctt agc ccg ggt gaa cgc gcc acc ctg tcc tgc cgc gcc tct cag gga 144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45
atc tct cgc tct tac ctc gcg tgg tac cag cag aaa ccc ggc cag gcc 192
Ile Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60
ccc agt ttg ctg ata tac ggt gcc tct agc cga gca act ggc atc cca 240
Pro Ser Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80
gac cgg ttc tca gga tct ggc tcc ggg act gac ttc act ctg acc atc 288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95
tcc aga ctg gag ccc gag gat ttc gcg gta tat tac tgc cag cag ttc 336
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe

100	105	110	
ggc agc agt cct tgg acc ttc gga cag ggt act aag gtg gag att aaa Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 115 120 125			384
cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu 130 135 140			432
cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat aac ttc Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe 145 150 155 160			480
tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln 165 170 175			528
tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac agc Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser 180 185 190			576
acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac tac gag Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 195 200 205			624
aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc tcc Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser 210 215 220			672
ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230 235			705

<210> 76
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 76

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45

Ile Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Ser Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 77

<211> 1413

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng conatumumab

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1413)

<400> 77

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc cag gtg cag ctt cag gaa agc ggg ccc ggc ctc gtg aag	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	
ccc tcc cag acc ctg tct ctt act tgt aca gtg agc ggt ggc agc att	144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile	
35 40 45	
tct tca ggc gat tac ttc tgg agt tgg att cgc caa ctg cct ggt aaa	192
Ser Ser Gly Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys	
50 55 60	
ggg ctg gaa tgg atc ggg cat att cac aat tca gga acc aca tat tat	240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr	
65 70 75 80	
aac cct tca ctg aag agc cgg gta act atc tcc gtt gac act agc aag	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
aaa cag ttc tcc ctc cgg ctg tct tct gtc aca gcc gct gac acc gct	336
Lys Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	
gtt tac tac tgt gca aga gat cgg ggt ggc gac tac tat tac ggc atg	384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met	
115 120 125	
gat gtt tgg gga cag gga acc acc gta aca gtg agc tca gcc tcc acc	432
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	

gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	672
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
210						215					220					
aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag	720
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	
225					230					235					240	
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccc	tgc	cca	gca	cct	768
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				245					250					255		
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccc	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	816
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
			260					265					270			
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	864
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
		275					280					285				
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	912
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
	290					295					300					
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac	960
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
305					310					315					320	
aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	1008
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				325					330					335		
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	1056
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
			340					345					350			
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg	1104
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
		355					360					365				
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	1152
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
	370					375					380					
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	1200
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
385					390					395					400	
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	1248
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				405					410					415		
acc	acc	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	1296
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			420					425					430			
aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca	1344

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 78
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 78

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

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

Ser Ser Gly Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Lys Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met
 115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 79
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 79

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 80

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 81

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 82

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 83

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

Gly

<210> 84
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 84

Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 85
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRL1 of hB273_L1-NE

<400> 85

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 86
<211> 16

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR11 của hB273_L1-NF

<400> 86

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Phe	Asn	Thr	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 87
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR11 của hB273_L1-NK

<400> 87

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Lys	Asn	Thr	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 88
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR11 của hB273_L1-NL

<400> 88

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Leu	Asn	Thr	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

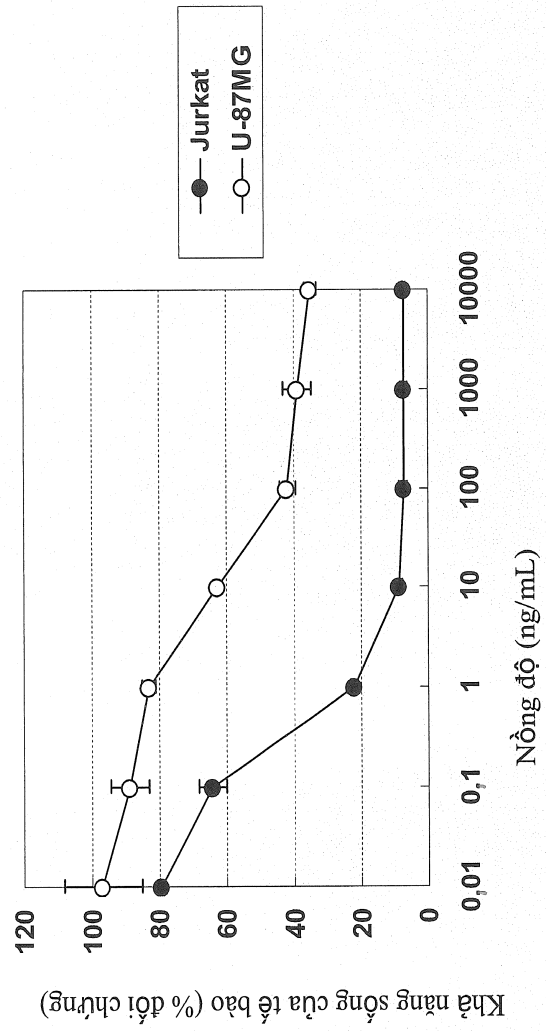
<220>
 <223> CDRH2 của hB273_H2-1-NE

<400> 89

Arg	Phe	Asn	Pro	Tyr	Asn	Glu	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

Fig. 1



2/51

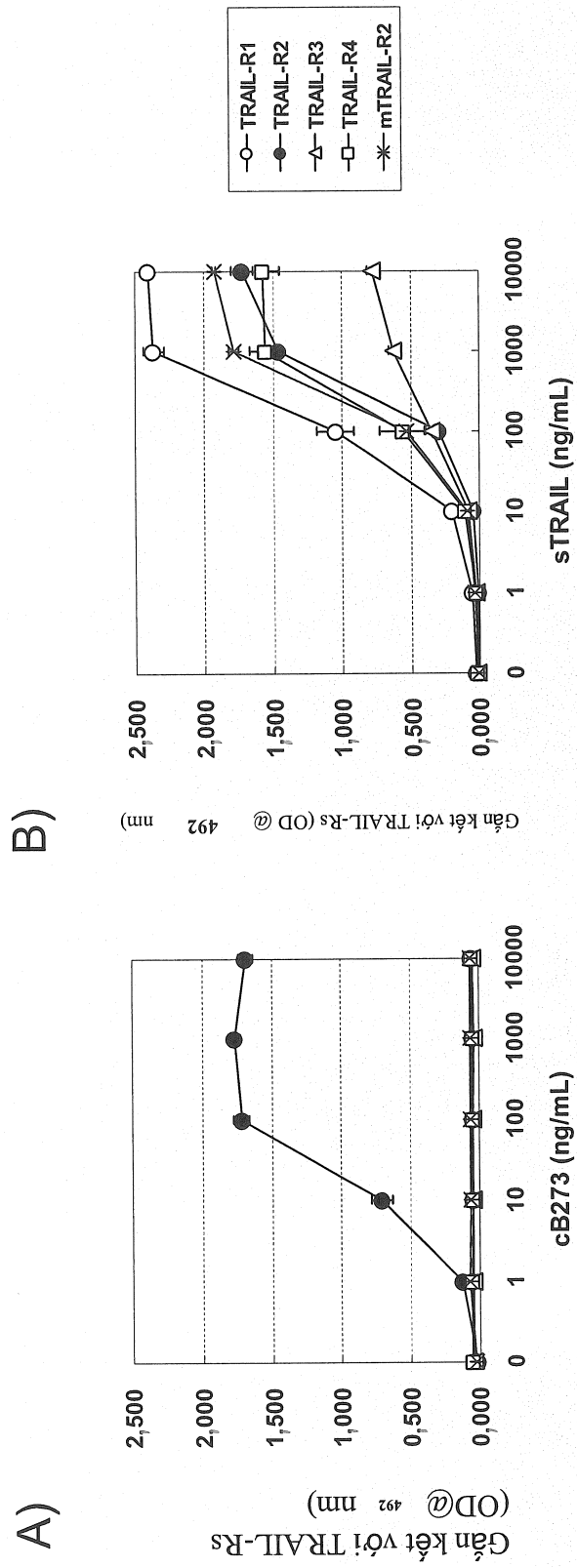
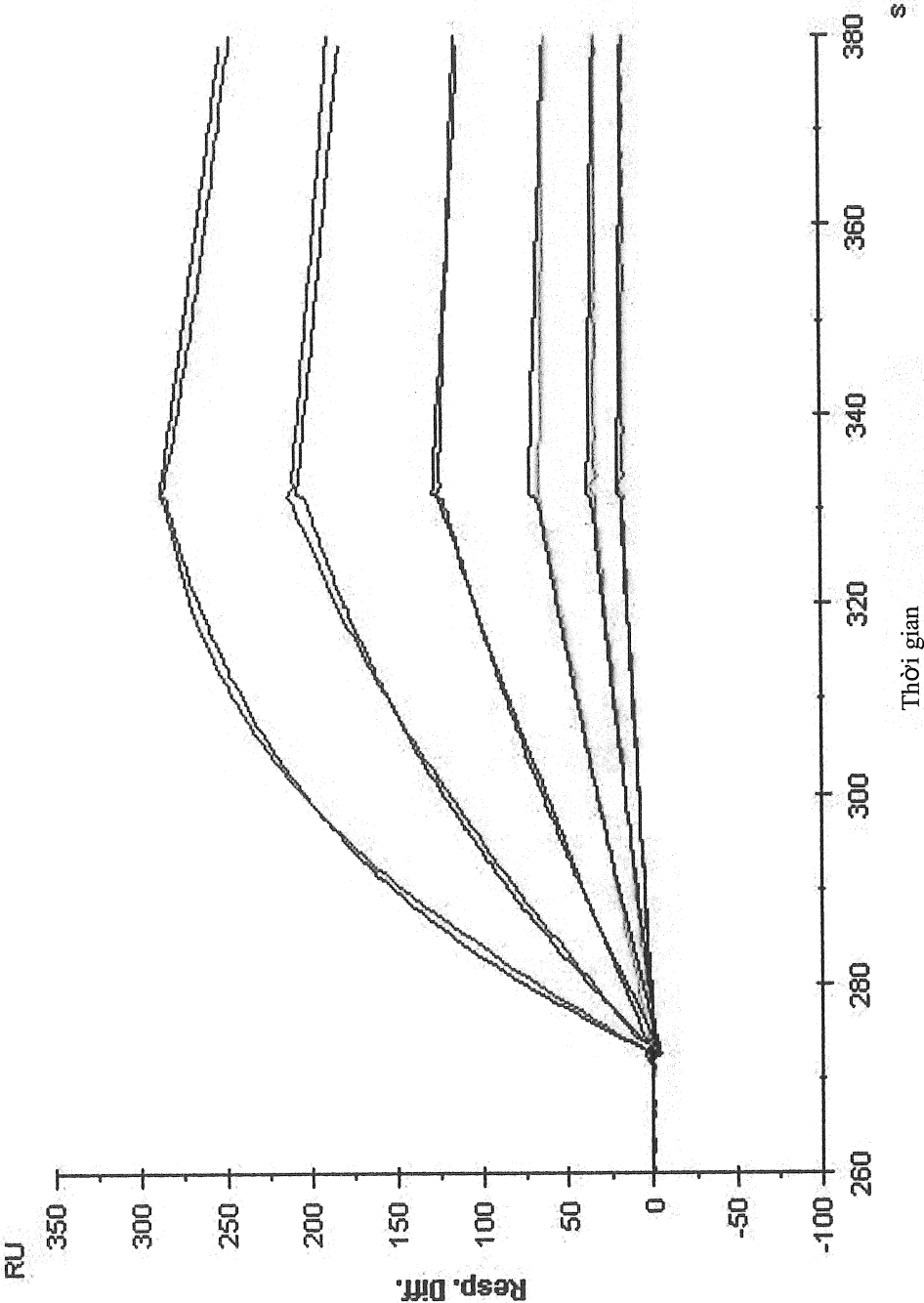


Fig. 2

Fig. 3



Kon (1/Ms)	Koff (1/d)	KD (nM)
1,69E+06	2,79E-03	1,65

Fig. 4

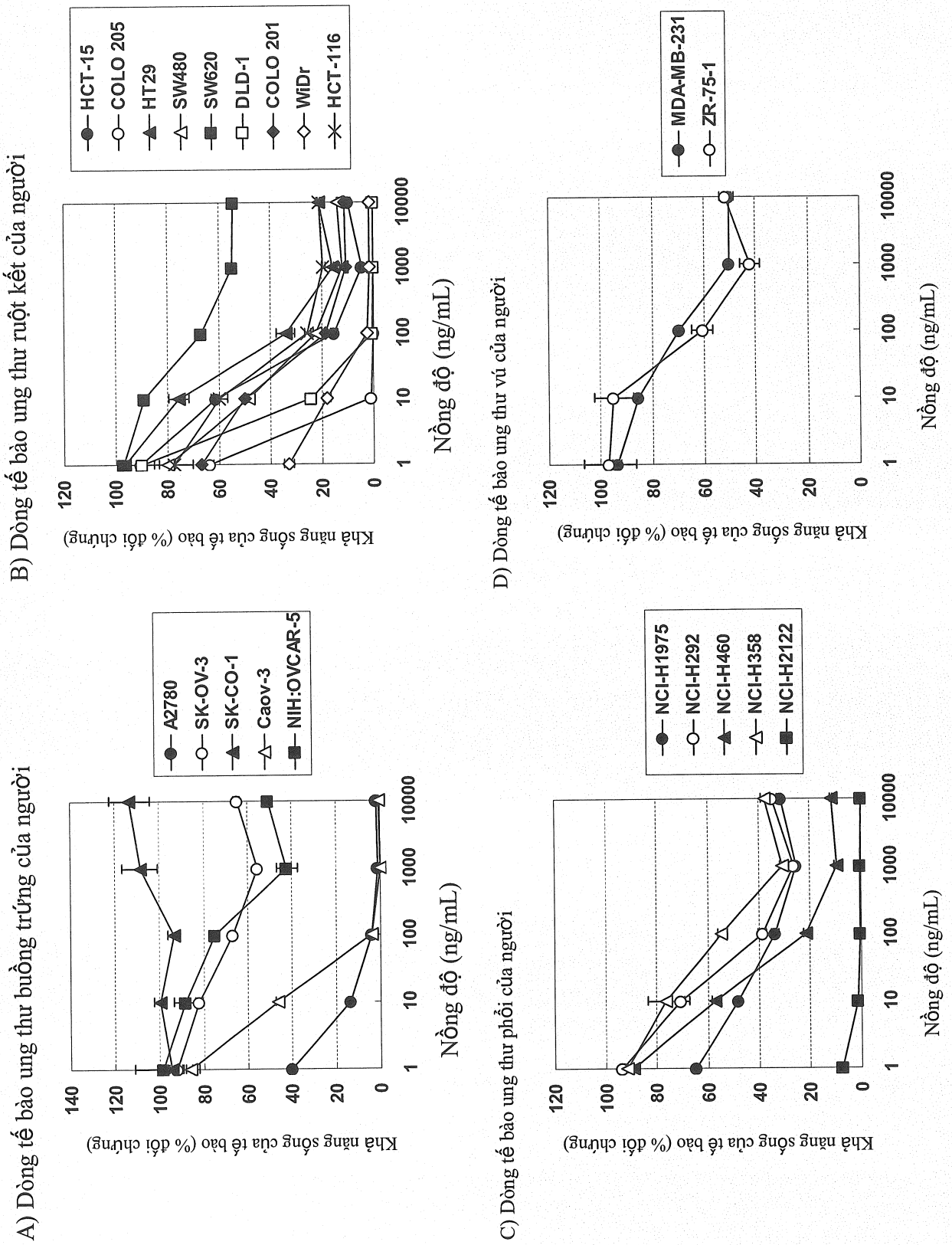
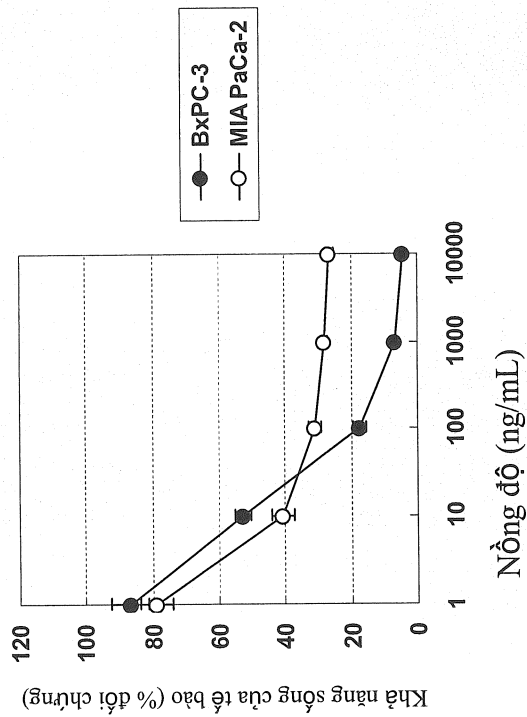
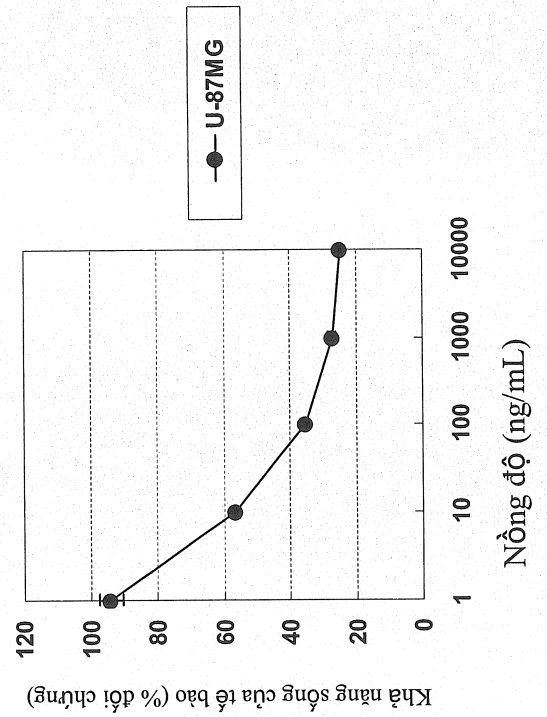


Fig. 5

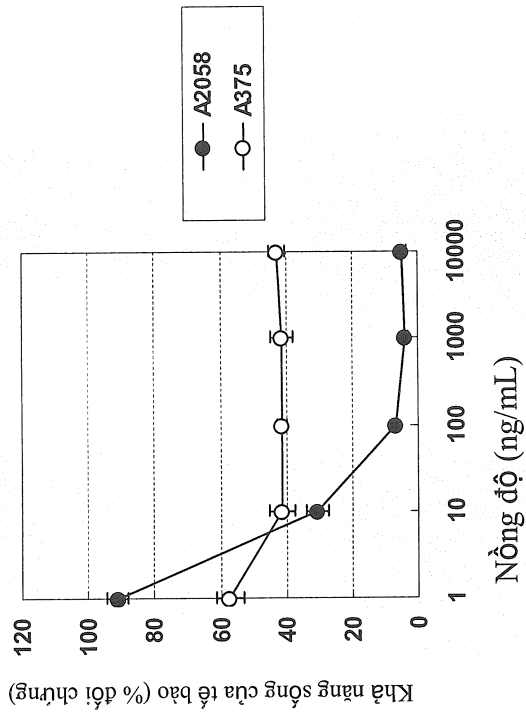
A) Dòng tế bào ung thư tuyến tụy của người



C) Dòng tế bào u nguyên bào đệm của người



B) Dòng tế bào khối u ác tính của người



D) Dòng tế bào ung thư màng tử cung của người

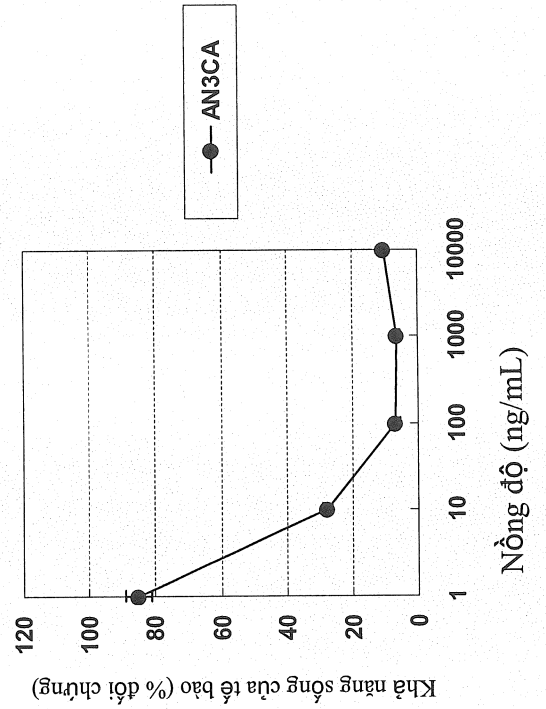


Fig. 6

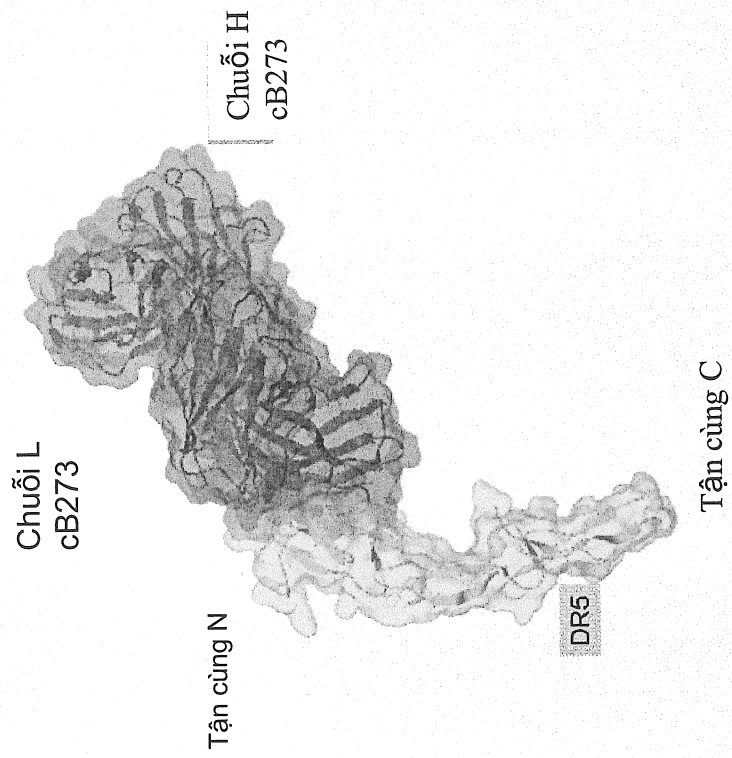
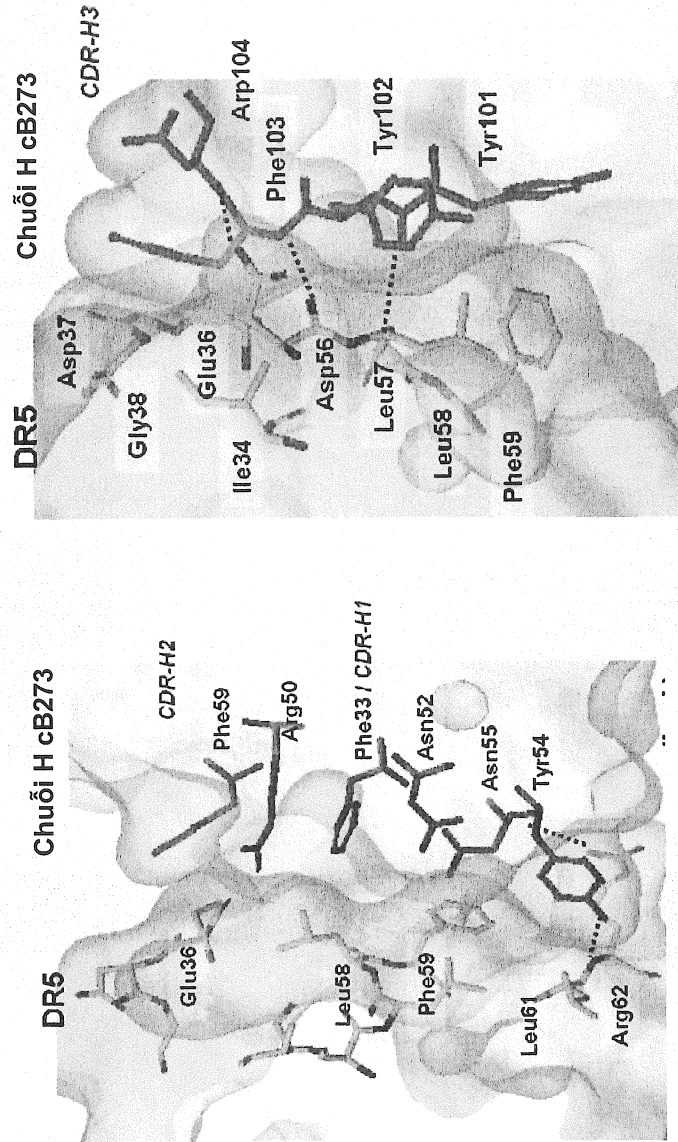
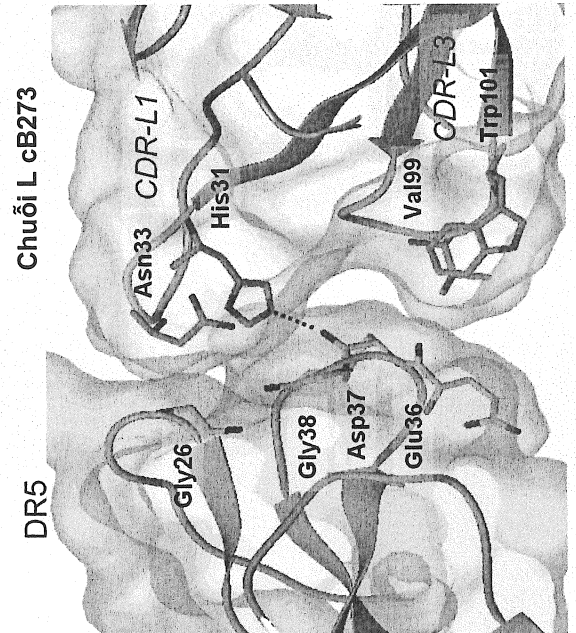


Fig. 7 A)



B)



8/51

Fig. 8-1

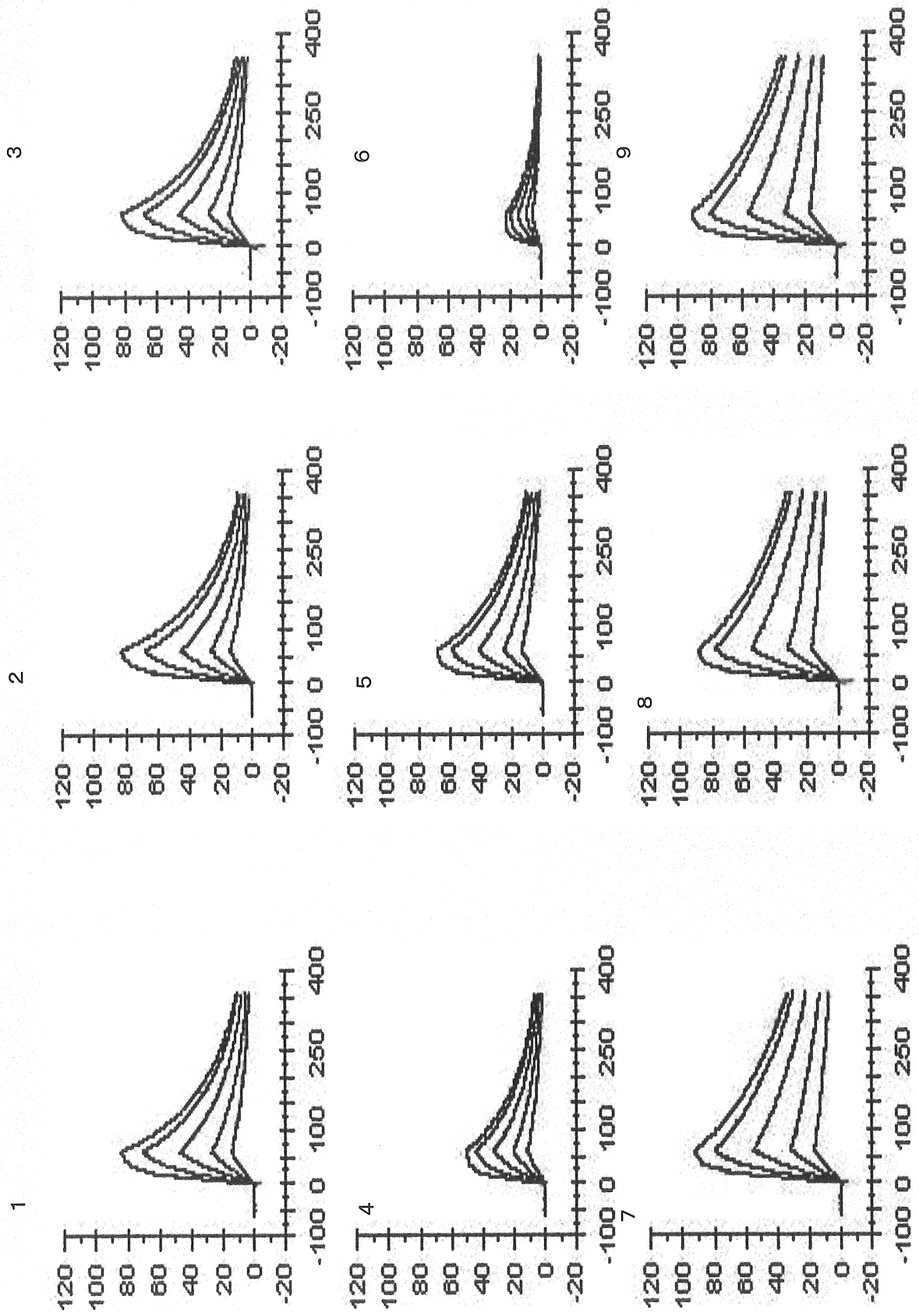
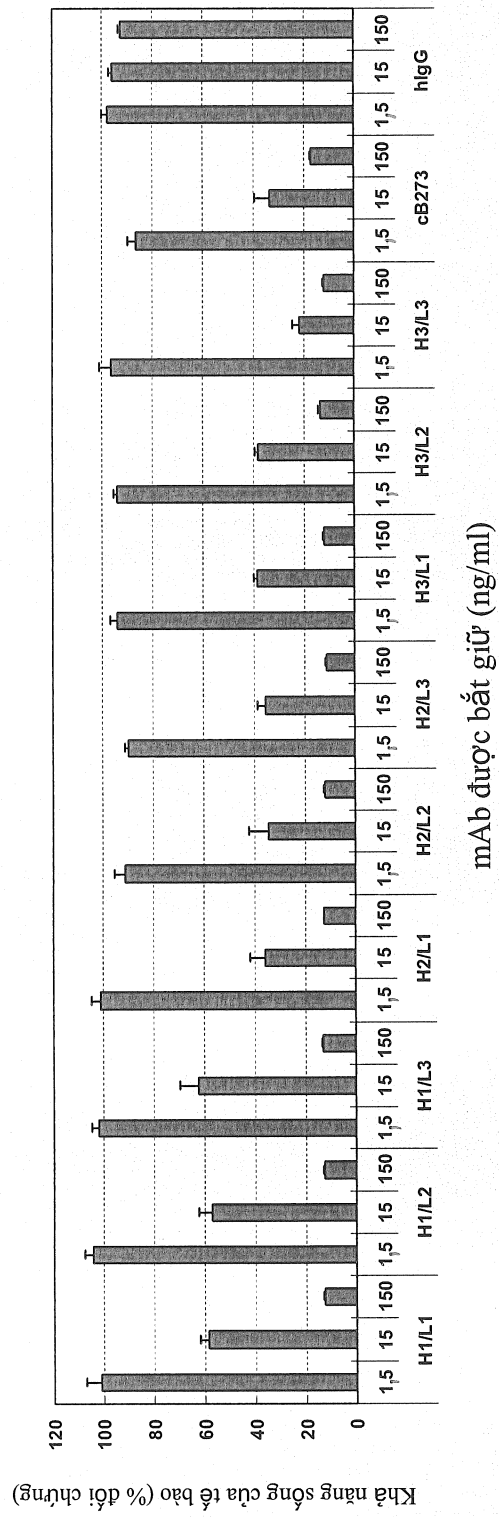


Fig. 8-2

Số lưu trữ	Tên	Kon (1/Ms)	Koff (1/d)	KD (nM)
1	hB273_H1/hB273_L1	1,804E+06	9,837E-03	5,45
2	hB273_H1/hB273_L2	1,441E+06	9,409E-03	6,53
3	hB273_H1/hB273_L3	1,527E+06	9,218E-03	6,04
4	hB273_H2/hB273_L1	1,853E+06	8,087E-03	4,36
5	hB273_H2/hB273_L2	1,711E+06	7,694E-03	4,47
6	hB273_H2/hB273_L3	1,889E+06	1,020E-02	5,40
7	hB273_H3/hB273_L1	1,809E+06	4,340E-03	2,40
8	hB273_H3/hB273_L2	2,117E+06	4,645E-03	2,19
9	hB273_H3/hB273_L3	2,027E+06	4,363E-03	2,15

Fig. 9



11/51

Fig. 10-1

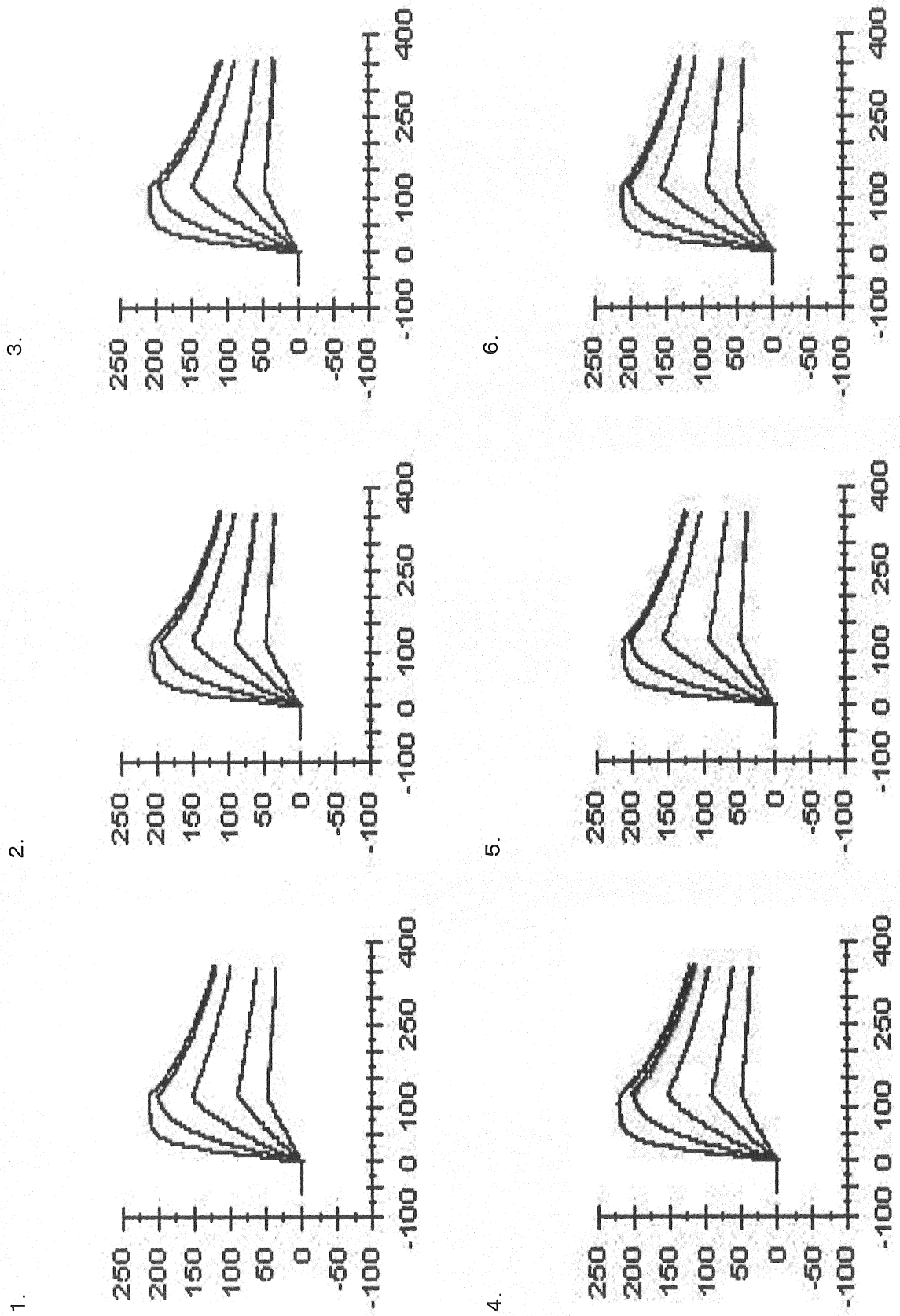


Fig. 10-2

Số lưu giữ	Tên	Kon (1/Ms)	Koff (1/d)	KD (nM)
1	hB273_H1-1/hB273_L1	2,074E+06	3,787E-03	1,83
2	hB273_H2-1/hB273_L1	2,014E+06	4,015E-03	1,99
3	hB273_H2-2/hB273_L1	2,036E+06	4,359E-03	2,14
4	hB273_H2-3/hB273_L1	1,770E+06	3,755E-03	2,12
5	hB273_H2-4/hB273_L1	2,327E+06	3,595E-03	1,55
6	hB273_H2-5/hB273_L1	2,196E+06	3,024E-03	1,38

Fig. 11

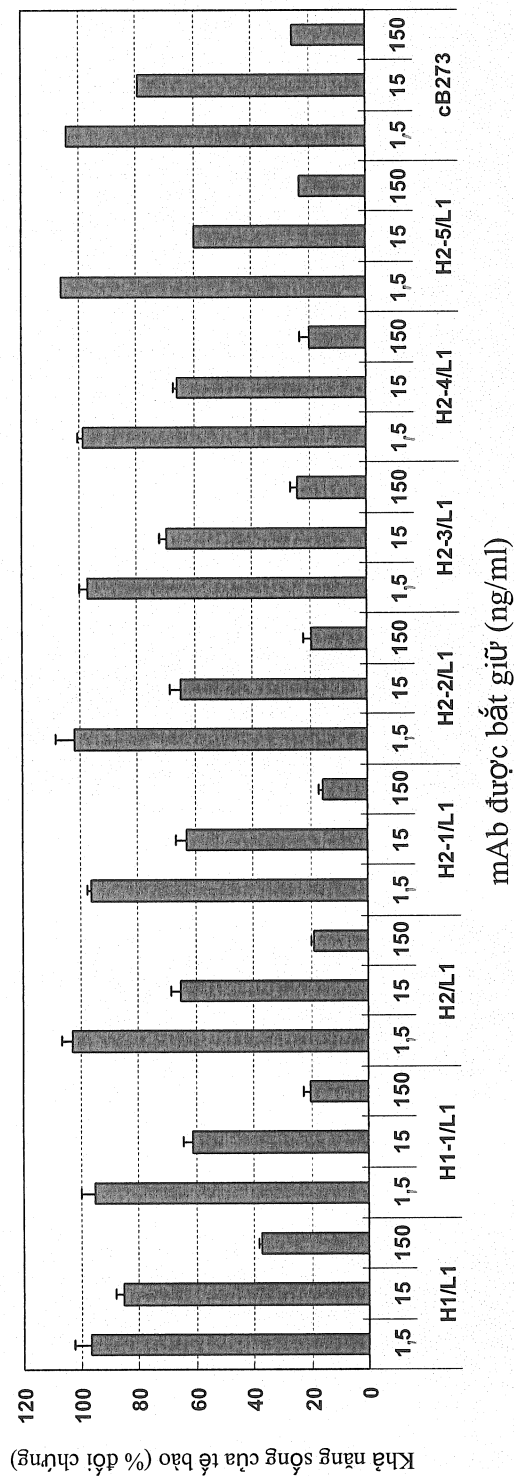


Fig. 12-1

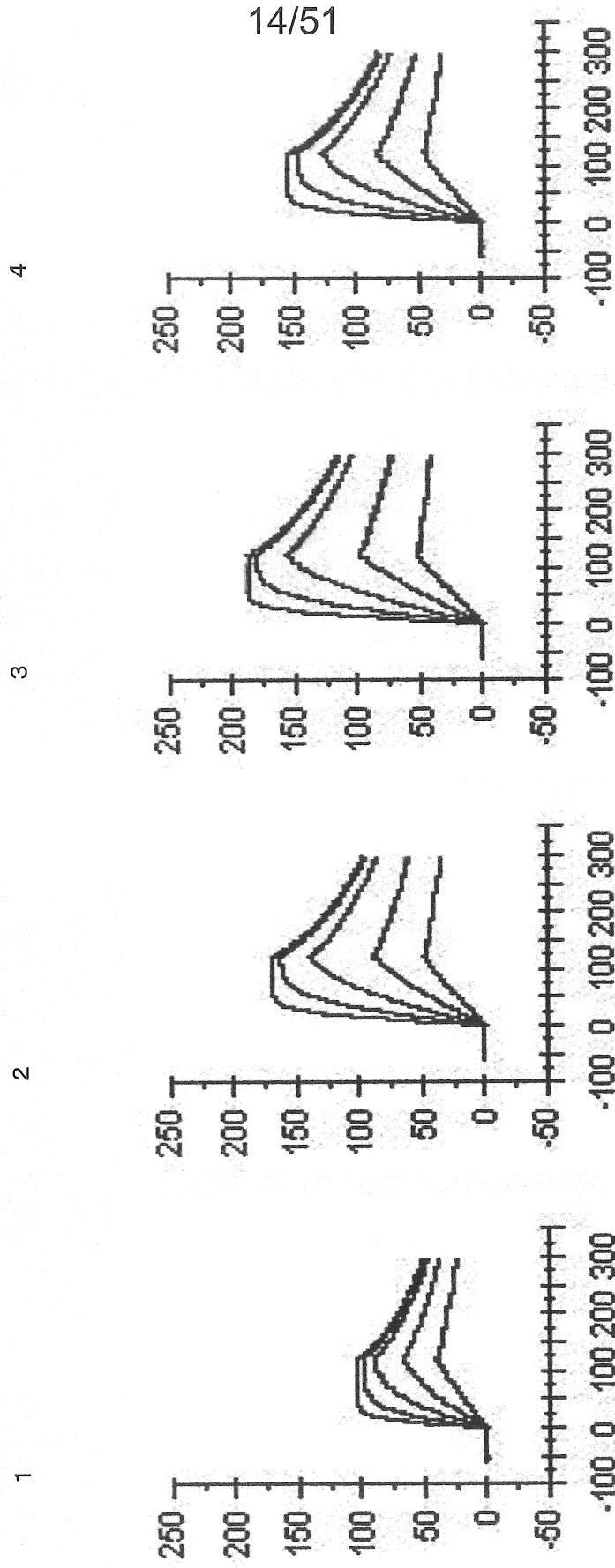


Fig. 12-2

Số lưu trữ	Tên	kon (1/Ms)	koff (1/d)	KD (nM)
1	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE	2,77E+06	5,59E-03	2,02
2	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF	2,92E+06	5,14E-03	1,76
3	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK	3,34E+06	4,63E-03	1,39
4	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL	3,34E+06	5,90E-03	1,76

Fig. 13-1 1

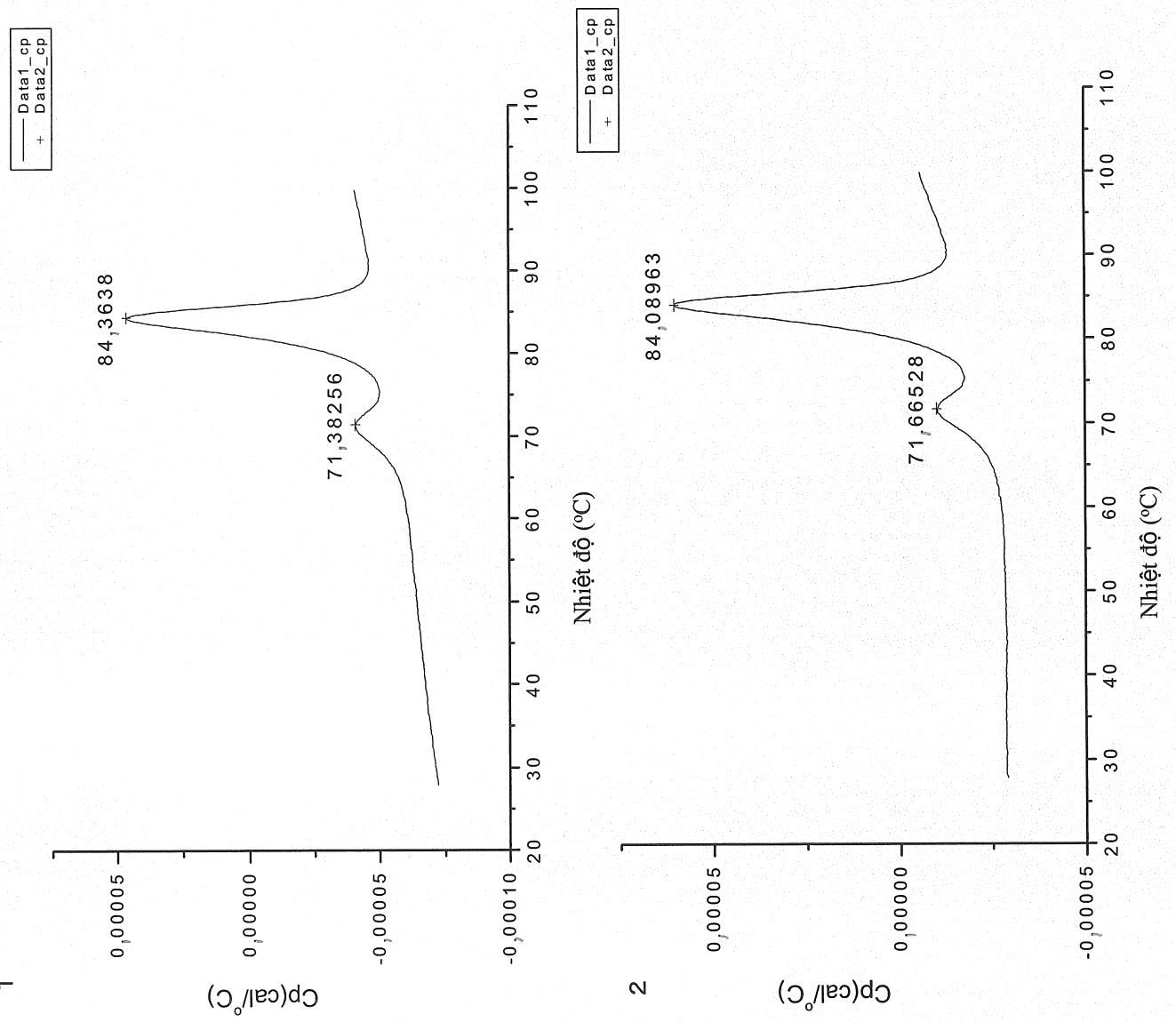


Fig. 13-2

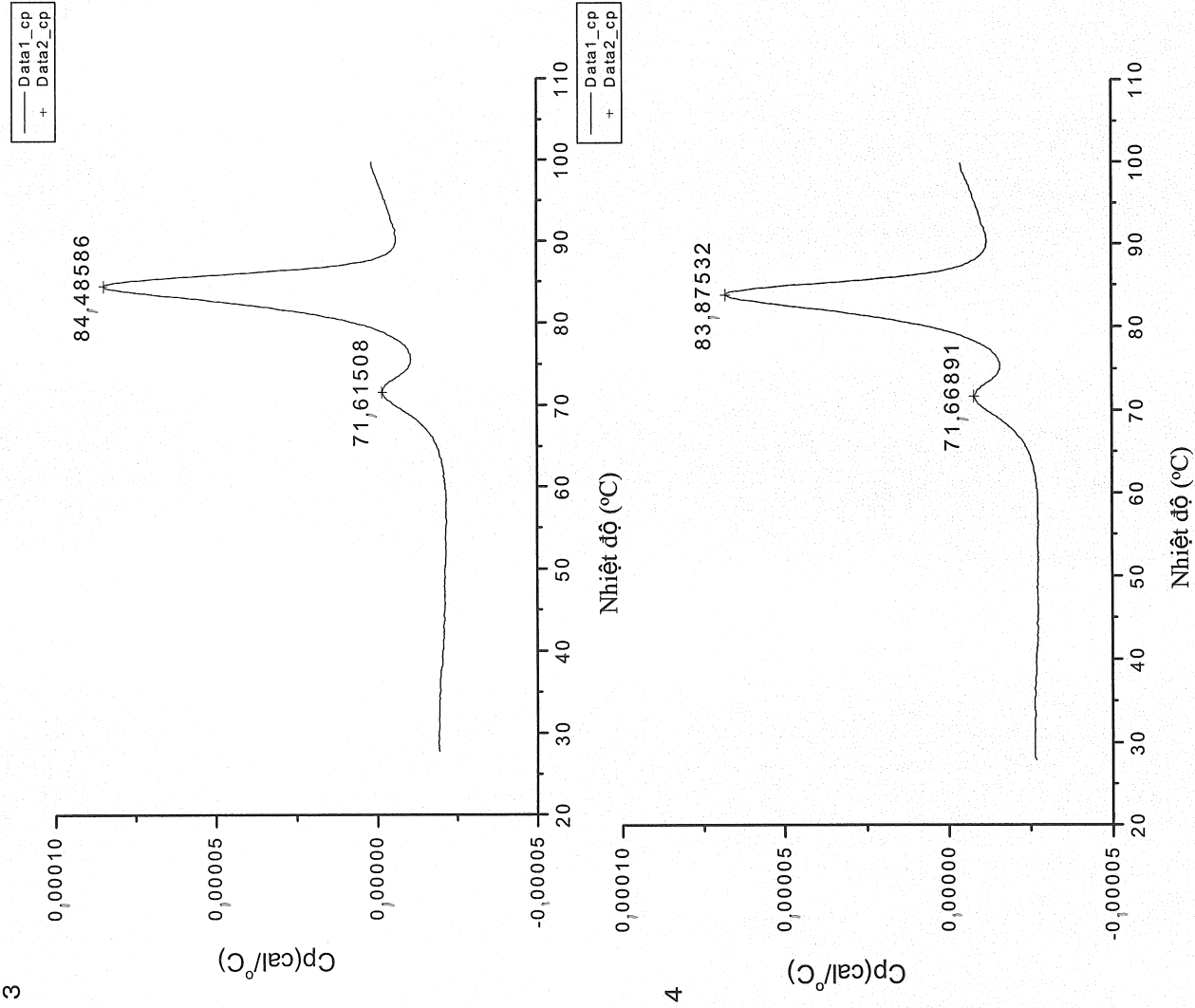


Fig. 13-3

Số lưu trữ	Tên	T _m (°C)
1	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE	83,9
2	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF	84,1
3	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK	84,5
4	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL	84,4

Fig. 14

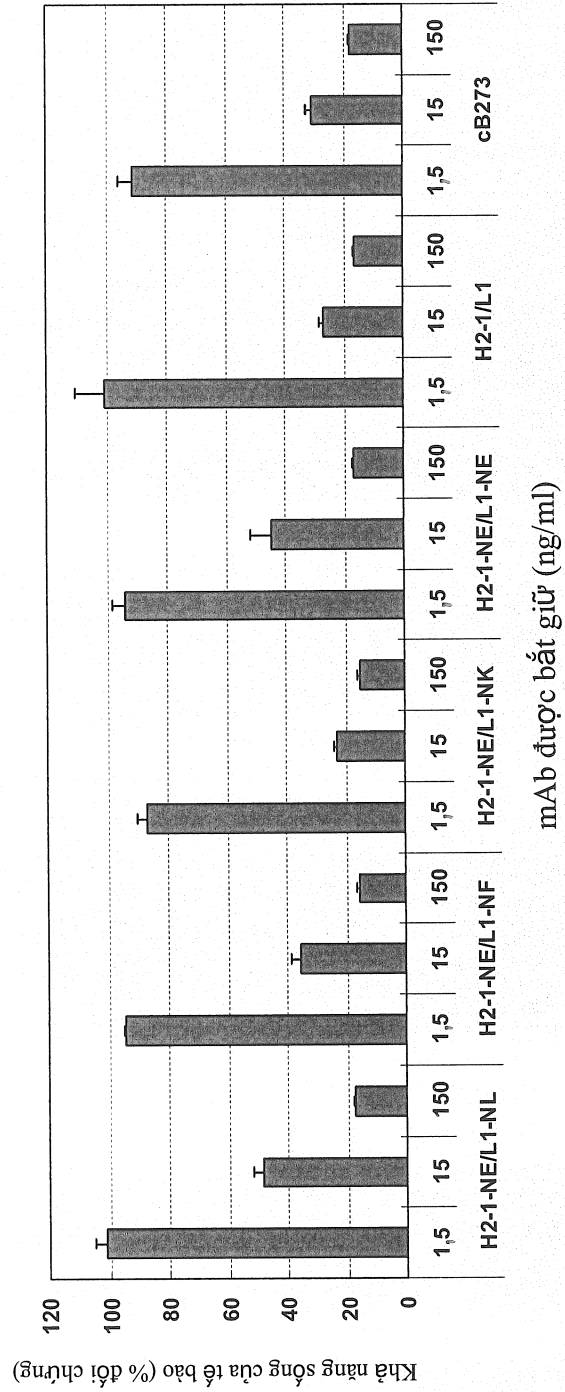
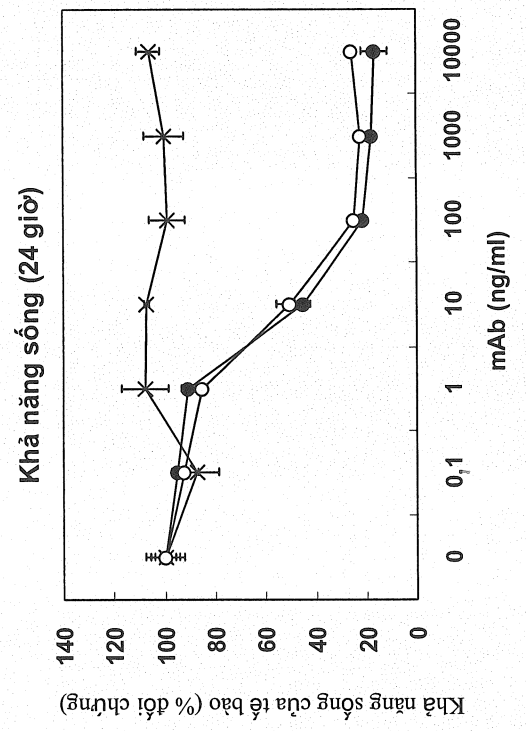
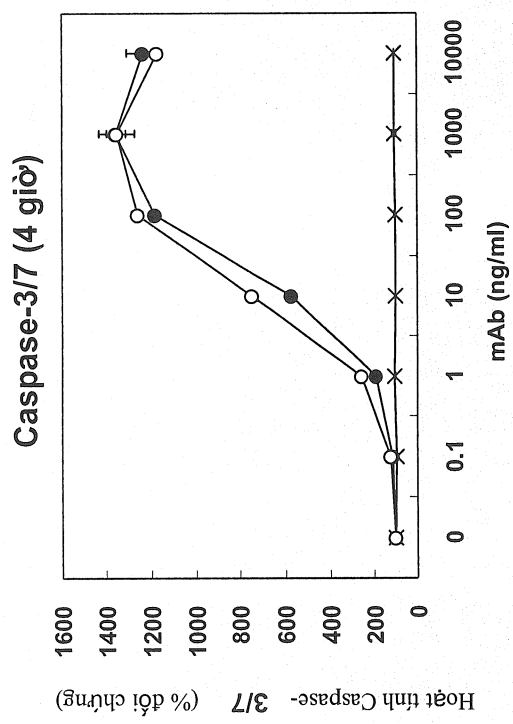


Fig. 15

A) HCT-15



B) U-87MG

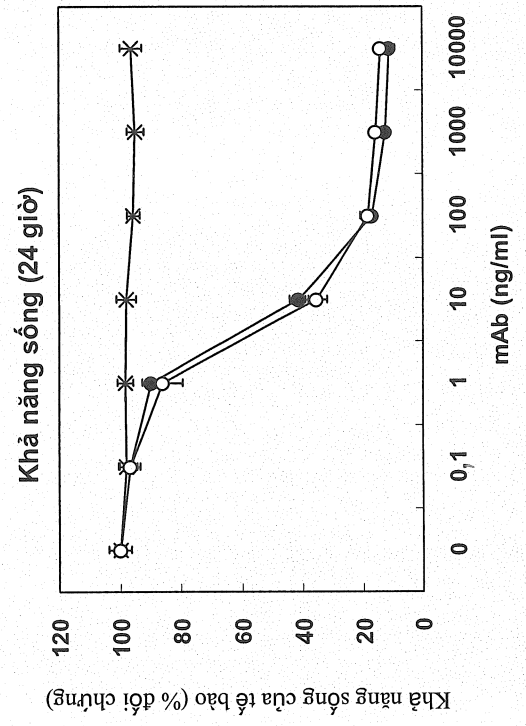
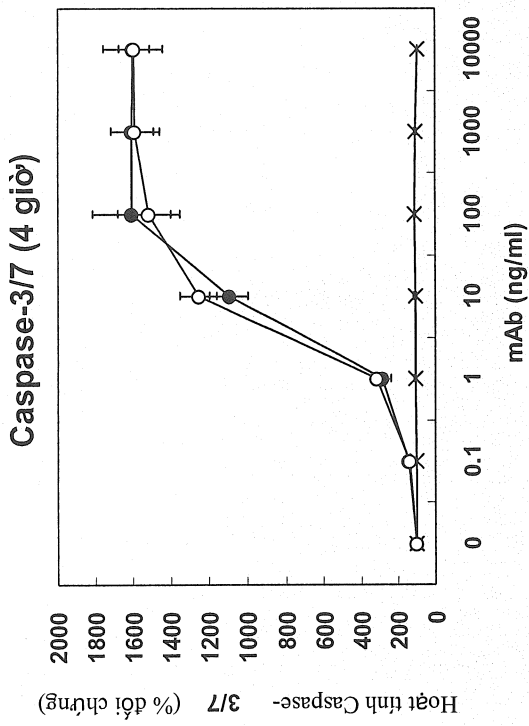


Fig. 16

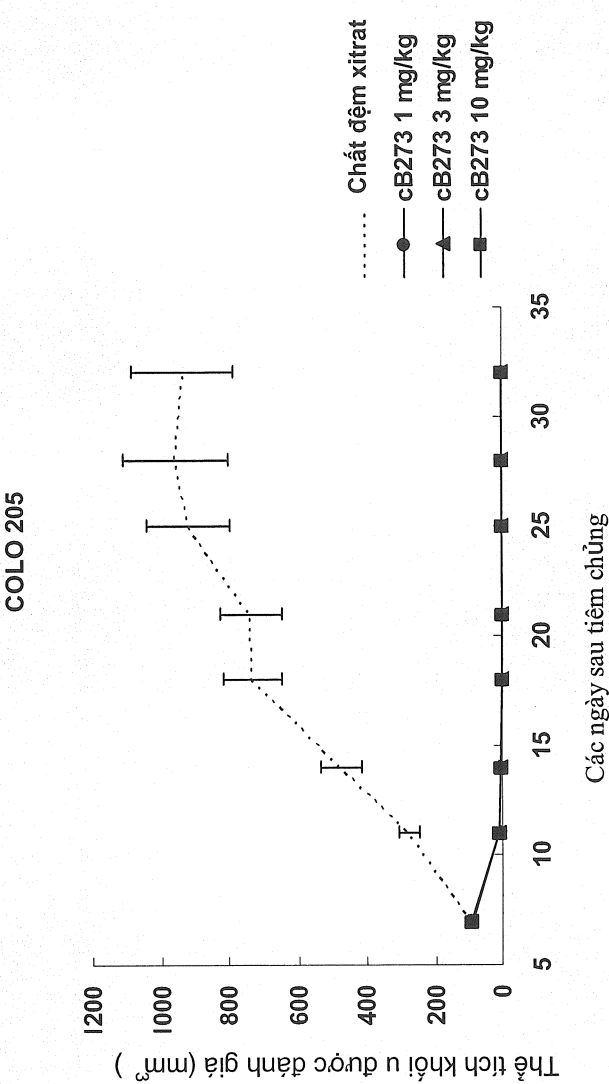


Fig. 17

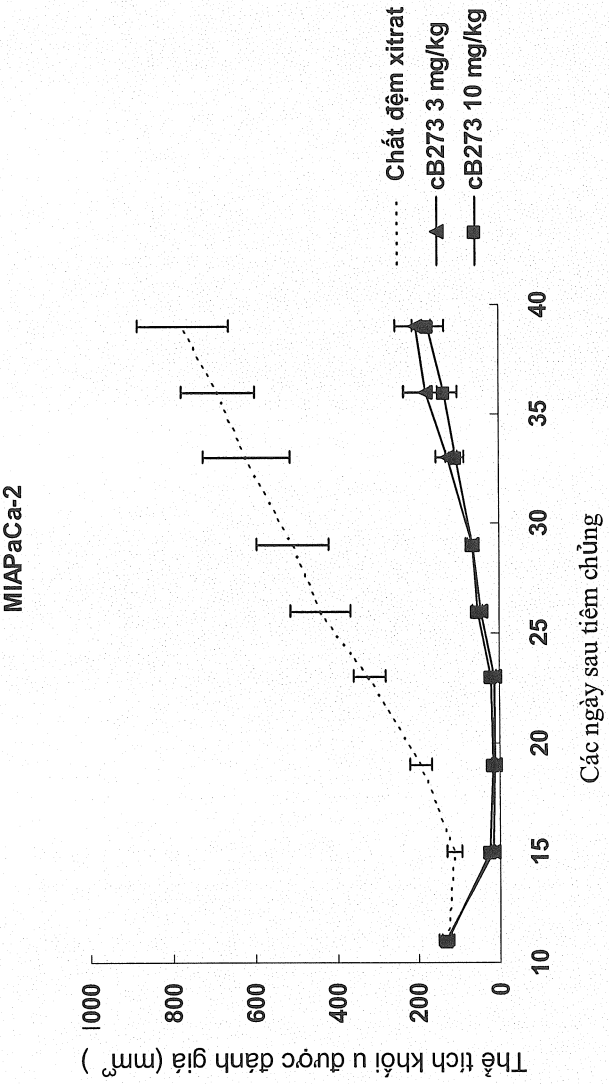


Fig. 18

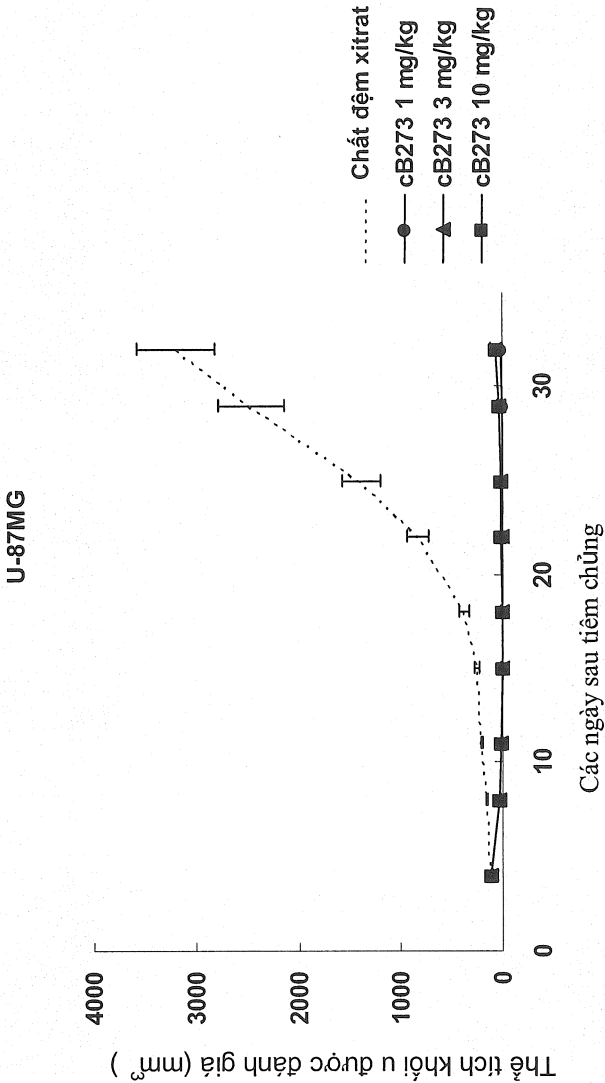


Fig. 19

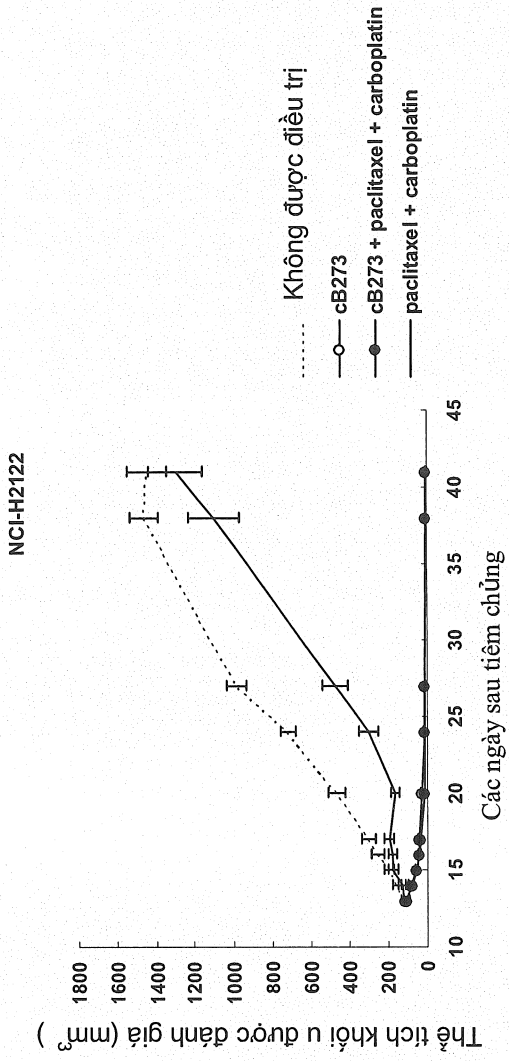


Fig. 20

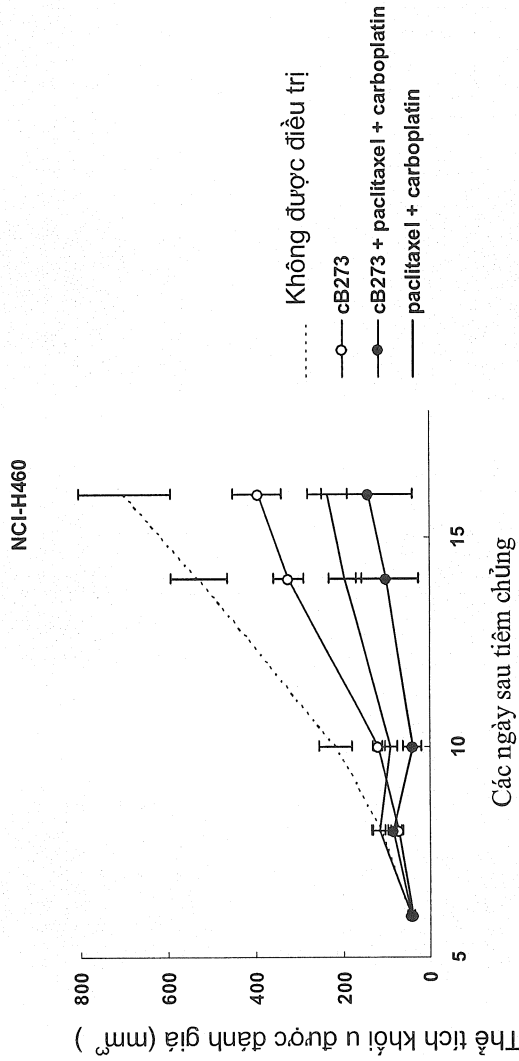


Fig. 21

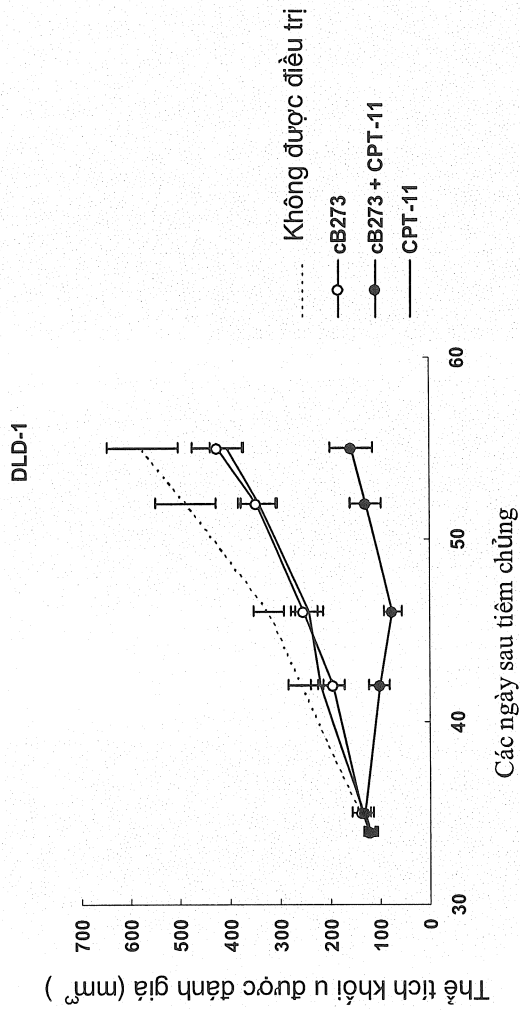


Fig. 22

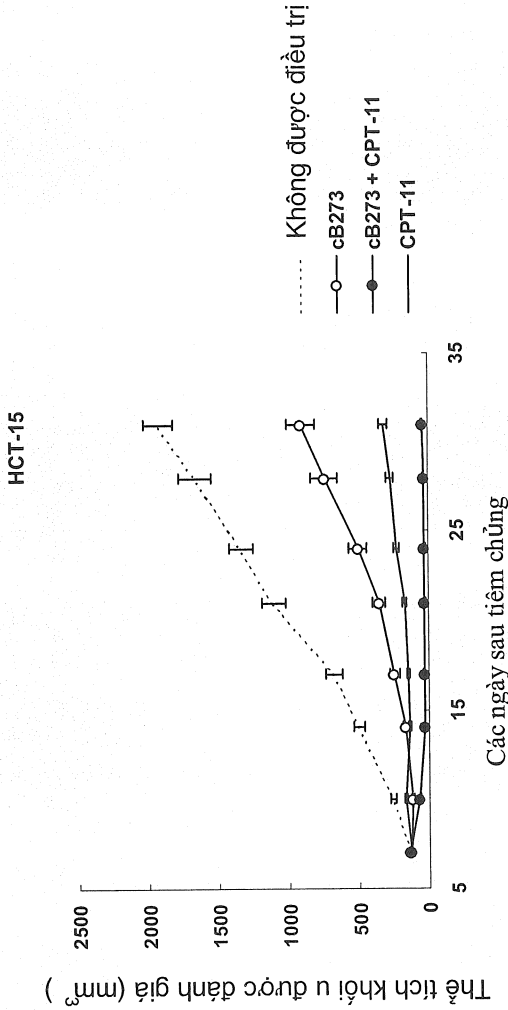


Fig. 23

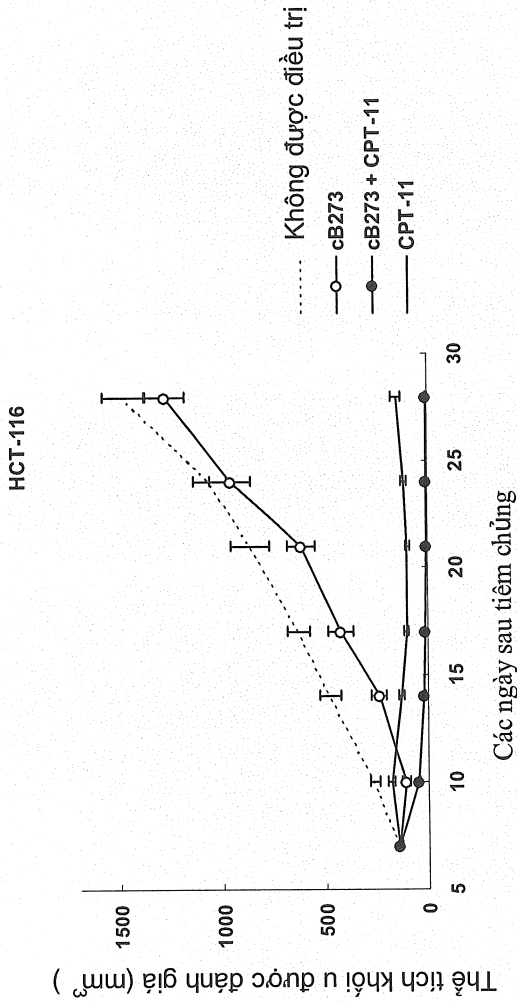


Fig. 24

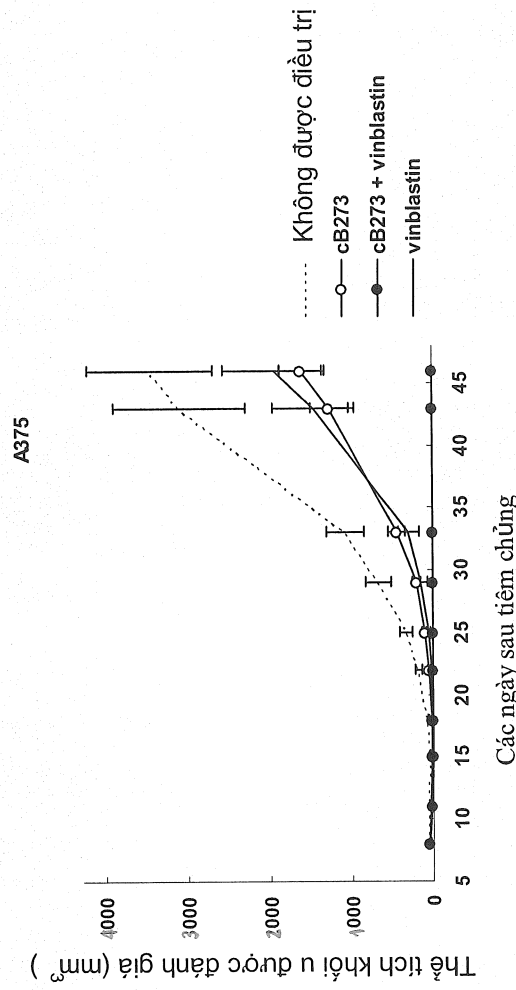


Fig. 25

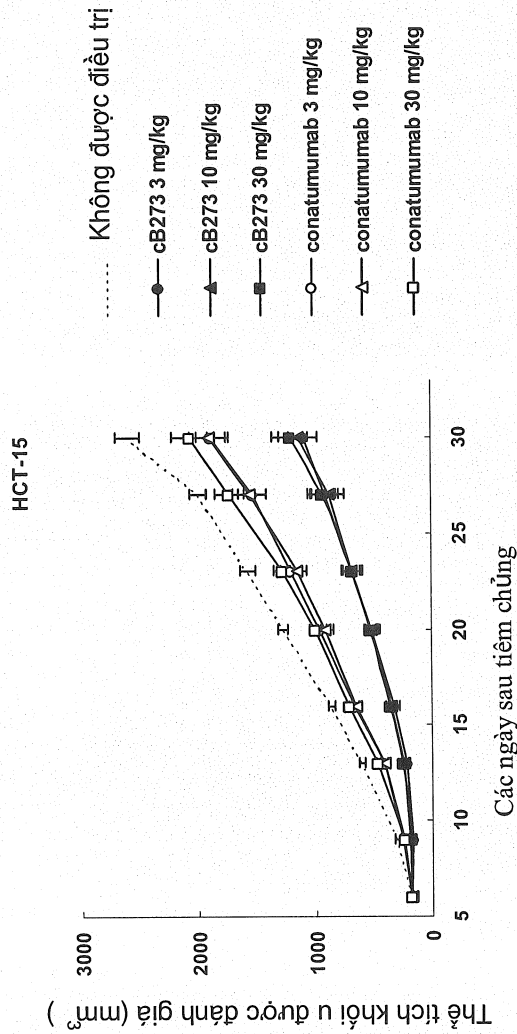


Fig. 26

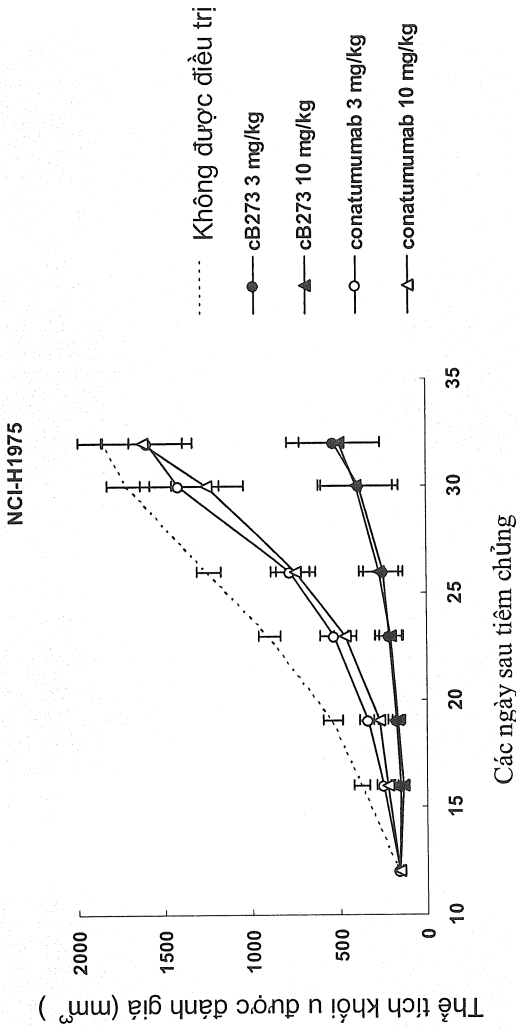


Fig. 27

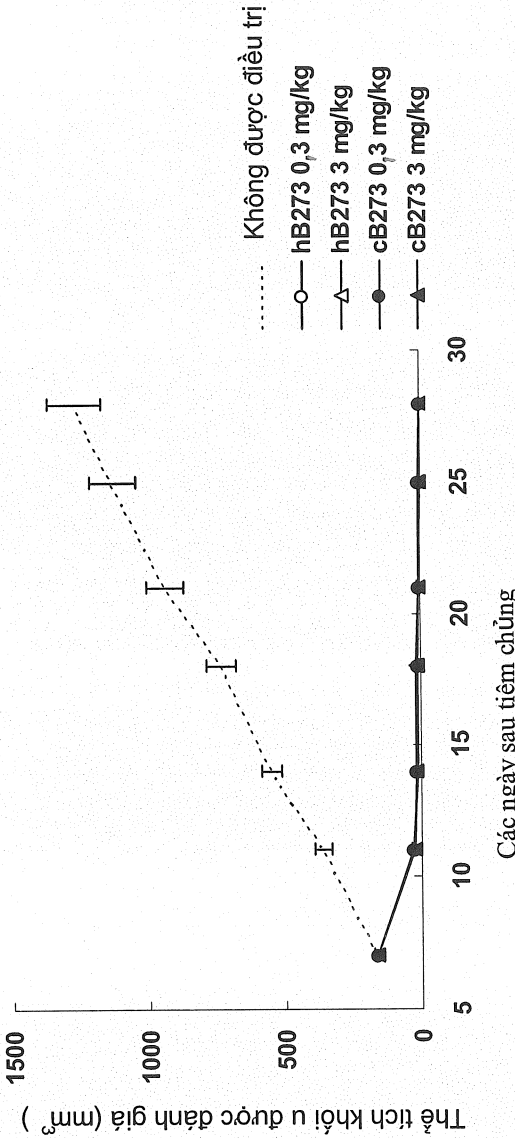


Fig. 28

SEQ ID NO: 7: Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng B273 kháng thể chuột

atgggatggagctgtatctttctctttctcctgtcagtaactgtaggtgtgttctctgaggttcagc
 tgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctgg
 ttactcatttattggctactttatgaactggatgaagcagagccatggaaagagccttgagtggatt
 ggacgttttaataccatacaatggtgatactttctacaaccagaagttcaagggaaggccacattga
 ctgtagacaaatcctctaccacagcccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgcagt
 ctatttttgtggaagatcggcgtattacttcgatagtggtgggctactttgactactggggccaaggc
 accactctcacagtctcctcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggccctggatctg
 ctgcccactaactccatggtgacctgggatgcctggtcaagggtatttccctgagccagtgc
 agtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgac
 ctctacactctgagcagctcagtgcactgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgca
 acgttgcccacccggccagcagcaccaaggtggacaagaaaattgtgcccagggtattgtggttgtaa
 gccttgcatatgtacagtcccagaagtatcatctgtcttcatcttccccccaaagcccaaggatgtg
 ctcaccattactctgactcctaagggtcacgtgtgtgtgtggttagacatcagcaaggatgatcccagg
 tccagttcagctggtttgtagatgatgtggaggtgcacacagctcagacgcaaccccgaggagca
 gttcaacagcactttccgctcagtcagtgaaacttcccatcatgcaccaggactgggtcaatggcaag
 gagttcaaatgcagggtcaacagtgcagctttccctgccccatcgagaaaaccatctccaaaacca
 aaggcagaccgaaggctccacaggtgtacacattccacctcccaaggagcagatggccaaggataa
 agtcagtctgacctgcatgataacagacttcttccctgaagacattactgtggagtggcagtggaat
 gggcagccagcggagaactacaagaacactcagcccatcatggacacagatggctcttacttctgtct
 acagcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggaggcaggaaatactttcacctgctctgtgtttaca
 tgagggctgcacaaccaccatactgagaagagcctctccactctcctggtaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1395)

SEQ ID NO: 8: Trình tự axit amin của chuỗi nặng B273 kháng thể chuột
 MGWSCIFLFLLSVTVGVFSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFIGYFMNWMKQSHGKSLEWI
 GRFNPNYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSTTAHMELLSLTSEDSAVYFCGRSAYYFDSSGGYFDYWGQG
 TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD
 LYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV
 LTITLTPKVTQVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
 EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWN
 GQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-465)

Fig. 29

SEQ ID NO: 9: Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ B273 kháng thể chuột

atgaagttgcctgtaggctggttggtgctgatgttctggattcctgcttccagcagtgatgttgatga
tgacccaaactccactctccctgcctgtcagtccttgagatcaagcctccatctcttgcagatctag
tcagagccttgtagacagtaatggaaacacctatctacattggtagctgcagaagccaggccagtcct
ccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctgggggtccagacaggttcagtggcagtg
gatcaggggacagatttcacactcaagatcagcagagtgaggagctgaggatctgggaatttatttctg
ctctcaaagtacacatgttccgtggacgttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgggctgat
gctgcaccaactgtatccatcttccaccatccagtgcagcagttaacatctggaggtgcctcagtcg
tgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggagattgatggcagtgaaacg
acaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagc
accctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaaga
catcaacttcacccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtggt

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-399), Vùng cố định (400-714)

SEQ ID NO: 10: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ B273 kháng thể chuột
MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQS
PKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRAD
AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSS
TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-133), Vùng cố định (134-238)

Fig. 30

SEQ ID NO: 15: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu khảm B273

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgatgttg
tgatgacccaaactccactctccctgctgtcagtcttgagatcaagcctccatctcttgcatc
tagtcagagccttgtagacagtaatggaacacatctacattggtacctgcagaagccaggccag
tctcaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctgggggtcccagacaggttcagtggca
gtggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgagggtgaggatctgggaattttattt
ctgctctcaaagtacacatgttccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgtacg
gtggccgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
tggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctc
gcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccacc
agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-402), Vùng cố định (403-717)

SEQ ID NO: 16: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu khảm B273

MVLQTQVFISLLWISGAYGDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLOKPGQ
SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-134), Vùng cố định (135-239)

Fig. 31

SEQ ID NO: 19: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu khảm B273

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggttcagc
 tgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctgg
 ttactcattttattggctactttatgaactggatgaagcagagccatggaaagagccttgagtggatt
 ggacgttttaataccatacaatggtgatactttctacaaccagaagttcaagggcaaggccacattga
 ctgtagacaaatcctctaccacagcccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgcagt
 ctatTTTTgtggaagatcggcgtattacttcgatagtgggggctactttgactactggggccaaggc
 accactctcacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgacctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgacctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaattctgtgacaa
 aactcacacatgcccacctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagttctctcttcccc
 ccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacctctccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 20: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu khảm B273

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFIGYFMNWMKQSHGKSLEWI
 GRFNPFYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSTTAHMELLSLTSEDSAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 32

SEQ ID NO: 27: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1
 atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
 taatgaccagctctccgctgagtccttctgtgactccaggggagcccgcaagcatctcttgtcgcag
 cagtcagtcactgggtccatagcaatgggaacacttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
 tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
 gtggctccgggacagatttcactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacggttgaggtctatta
 ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcggtcccggcacaaaagtcgagatcaagcgtacg
 gtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
 tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
 gcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccacc
 agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtggt

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-402), Vùng cố định (403-717)

SEQ ID NO: 28: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1
 MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
 SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-134), Vùng cố định (135-239)

Fig. 33

SEQ ID NO: 29: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L2

atgggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacgtcg
tcatgacacagacacctctgagcctgcccgtgtctctgggcgaaccgcagatatttctttaggtc
atctcagtctctggtgcacagtaacggaaacacatatctccattggtacctgcagaagccaggtcag
tcccaaagctcctgatctataaggtgagcaacagattctccggagtgctgatcgattcagcggga
gtggttcagggaccgacttcaccttgaagattagccgggtcgaggccgaggatgttgagtgatattt
ctgtagccagagtacacacgtgccctggaccttcggacctgggactaaagtcgagattaaacgtacg
gtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccg
tggtgtgctgctgaataacttctacccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctc
gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccacc
agggcctgagctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtggt

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-402), Vùng cố định (403-717)

SEQ ID NO: 30: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L2

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDVVMQTPLSLPVSLGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
SPKLLIYKVSNRFSVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-134), Vùng cố định (135-239)

Fig. 34

SEQ ID NO: 31: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L3

atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacgtgg
tgatgacgcagactccgctgtcactgcccgtatctctgggagagcctgccagcatcagctgcaggag
ctctcaatcactggtgcactctaacggtaatacctacctccactggtatctccagaagccaggacaa
tccccaaagttgctcatatataaagtgtccaaccggttctcaggagtccttgaccggtttagcggt
gtggctctggtacagatttcaccctgaaaatatcaagggtgaagcggaagacgtaggagtgatattt
ttgcagccagagcaccatgtcccctggacatttggggggcggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacg
gtggcgcggccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
tggtgtgcctgctgaataacttctacccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgcct
gcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccacc
agggcctgagctccccgcacccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-402), Vùng cố định (403-717)

SEQ ID NO: 32: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L3

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDVVMQTPLSLPVSLGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-134), Vùng cố định (135-239)

Fig. 35

SEQ ID NO: 33: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H1
 ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTgagcCAAGTTCAGC
 TCGTGCAAGTCCGGCGCGGAGGTTAAGAAACCAGGCGCATCCGTTAAAGTGTCATGTAAGGCCAGCGG
 GTACTCCTTTATCGGCTACTTTATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGTATGGGCCTGGAGTGGATG
 GGACGGTTTAATCCATATAATGGCGATACTTTTTTACAACCAGAAATTTAAAGGAAGGGTCACTCTCA
 CAGTGGATAAAAGCACTAGTACGGCTTACATGGAAGTGTCTCCCTCAGATCAGAAGATACTGCCGT
 CTACTACTGCGCCCGAAGTGCTTACTATTTTCGACAGCGGGGGCTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGG
 ACCCTGGTAACTGTGagcTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCA
 AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
 CGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCC
 CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACATAAGACCACCCCTCCCGTGTCTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
 GGCAAA

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 34: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H1
 MKHLWFFLLLVAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWVRQAPGMGLEWM
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHSTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 36

SEQ ID NO: 35: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H2

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtccagc
tggtgcagagtggagccgaggtaaaaaaccaggggctagtgtcaaggtctcctgtaaggcatctgg
ttactcttttataggatacttcatgaactggatgaagcagctctcccggatgtctctgagtggtgatt
ggcagattcaaccctacaacggggacactttttataatcagaagttcaaagggaaagccactctga
ccgtggacaagtcaacttccacagcatacatggaattgtcctcactgaggtccgaagataccgccgt
gtacttctgcgctcggagtgttattattttcgatagcggaggggtattttgactattgggggcaaggg
acccttgtaaccgtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgctgggtcaaggactacttccccgaaccctgac
cgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctacatct
gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaattctgtgacaa
aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttcttcttcccc
ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
aaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtgggtcagcgtcctcacgctcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgaga
aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccggga
ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
gtggagtgggagagcaatggccagccccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
acggctccttcttctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
ggcaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 36: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSGYFMNWMKQSPGMSLEWI
GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARSAYYFDSSGGYFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSP
GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 37

SEQ ID NO: 37: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H3

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaagtgcagc
tcgtgcaaagcggcgctgaagtgaaaaaccaggagcctcagtcagggtgctgtaaggcctccgg
gtatagcttcatcggctattttatgaactggatgaagcagagcccgggcaaaagcctcgaatggatc
gggagattcaatccatacaatgggtgacaccttttacaatcagaaattcaaaggcaaggccacgctga
ctgtagacaaatccaccagcacagcccatggaattgtcttcctgaggtctgaggataccgcggt
gtacttttgtggccgaagtgcgtattatttcgattcaggcggttacttcgattactggggtcagggg
acgctcgtcaccgtaagctcagcctccaccaaggggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgctgac
cgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
ggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatct
gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaatcttgtgacaa
aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttctcttcccc
ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtgggacgtga
gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
aaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgaga
aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgcccccatccccggga
ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
gtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
ctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 38: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H3

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMKQSPGKSLEWI
GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDYAVYFCGRSAYYFDGGYFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 38

SEQ ID NO: 39: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1
 atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcttctgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggtacttcatgaactggatgctggcagggccctggcatgggactggaatggatg
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaaattcaagggcagagtgaccctga
 ccgtggacaagagcaccagcaccgctacatggaactgagcagcctgctggagcgaggataccgccgt
 gtatttctgctggcgagaagcgctactacttgcacagcggcggtacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcgccagcagccgctgggtgctgctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcggtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttcttctcccc
 ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtagacaacagcagcgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 40: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H1-1
 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFIGYFMNWMRQAPGMGLEWM
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCGRSAYYFDSSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 39

SEQ ID NO: 41: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1
 atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccacctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcgaggataccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctactacttgcacagcggcggtacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaaggggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgtac
 cgtgagctggaactcagggcgccctgaccagcggcggtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttcttcttcccc
 ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 42: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1
 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 40

SEQ ID NO: 43: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-2
 atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcccacatggaactgagcagcctgcgagcagaggataaccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctactacttgcacagcggcggtacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtgac
 cgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcggtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtcttctcttcccc
 ccaaaaccaaggaacccctcatgatctcccgacccttgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 44: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-2
 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDTAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWQGG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 41

SEQ ID NO: 45: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-3
 atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tgggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggtacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcccacatggaactgagcagcctgcggagcgaggataaccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgccctactacttcgacagcggcggtacttgcactactggggccagggc
 accctgggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccctgtgac
 cgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaattctgtgacaa
 aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttctcttcccc
 ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtacaacagcagcgtaccgggtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 46: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-3
 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDTAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 42

SEQ ID NO: 47: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-4
 atgaaacacctgtggtttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcagaggataccgccgt
 gtacttctgcggcagaagcgcctactacttcgacagcggcggctacttcgactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaaggggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgctgtcaaggactacttccccgaaccctgtgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgacgtgacctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtagaa
 aactcacacatgcccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttctcttcccc
 ccaaaaccaaggaacaccctcatgatctcccggaaccttgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 48: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-4
 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 43

SEQ ID NO: 49: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-5
 atgaaacacctgtgggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaagccagcgg
 ctacagcttcatcggtacttcatgaactggatgaagcagagccccggcaagagcctggaatggatc
 ggccggttcaacccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcagggataccgccgt
 gtacttctgcggcagaagcgctactacttgcacagcggcggtacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgaactcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctgggggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcggtgcacaccttccccgctgtcctgagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtcttctcttcccc
 ccaaaaccaaggaacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtgaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtacaacagcagcgtaccgggtggtcagcgtcctcacgcctcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagccccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 50: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-5
 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSGYFMNWMKQSPGKSLEWI
 GRFNPNYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWQGQ
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 44

SEQ ID NO: 51: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NE

atggtgctgcagacccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
 taatgacccagtcctcgctgagtccttctgtgactccaggggagcccgcaagcatctcttgctcgag
 cagtcagtcactggtccatagcaatgagaacacttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
 tccccacagctcttgatctacaagggtgtccaatcgggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
 gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacgttgagtgctatta
 ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcgggtcccggcacaaaagtcgagatcaagcgtacg
 gtggccgccccctccgtgttcattcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
 tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaagggtgcagtgggaagggtggacaacgcct
 gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaagggtgtacgcctgaggtgaccacc
 agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-402), Vùng cố định (403-717)

SEQ ID NO: 52: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NE

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNENTYLHWYLQKPGQ
 SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-134), Vùng cố định (135-239)

Fig. 45

SEQ ID NO: 57: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NF
 atggtgctgcagacccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
 taatgacccagtcctccgctgagtccttcctgtgactccaggggagcccgcaagcatctcttgtcgcag
 cagtcagtcactggtccatagcaatttcaacacttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
 tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
 gtggctccgggacagatttctactcttaagatttcaagagtgaggcagaagacgttgagtgctatta
 ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcggtcccggcacaaaagtcgagatcaagcgtacg
 gtggcgcgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccg
 tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
 gcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgaccacc
 agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg
 Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-402), Vùng cố định (403-717)

SEQ ID NO: 58: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NF
 MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNFNTYLHWYLQKPGQ
 SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-134), Vùng cố định (135-239)

Fig. 46

SEQ ID NO: 61: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NK
 atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
 taatgacccagtcctccgctgagtccttcctgtgactccaggggagcccgcaagcatctcttgtcgcag
 cagtcagtcactgggtccatagcaataagaacactttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcgag
 tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
 gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtgaggagcagaagacgttggagtcctatta
 ttgctcacagagcacacatgtcccttgactttcggtcccgccacaaaagtcgagatcaagcgtacg
 gtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccg
 tgggtgtgcctgctgaataaacttctaccccagagagggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctt
 gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccacc
 agggcctgagctcccccgctcaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-402), Vùng cố định (403-717)

SEQ ID NO: 62: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NK
 MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNKNTYLHWYLQKPGQ
 SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-134), Vùng cố định (135-239)

Fig. 47

SEQ ID NO: 65: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NL
 atgggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
 taatgaccagctctccgctgagctcttctgtgactccagggagcccgaagcatctcttgctgcag
 cagtcagtcactgggtccatagcaatctgaacacttacctgcattgggtacctccaaaaccagggcag
 tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
 gtggctccgggacagatttcactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacgcttgaggtctatta
 ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcgggtcccggcacaaaagtcgagatcaagcgtacg
 gtggccgccccctccgtgttcattcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccg
 tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
 gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcacctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccacc
 agggcctgagctccccgcaccaaagagcttcaacaggggggagtggt

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-402), Vùng cố định (403-717)

SEQ ID NO: 66: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kiểu hB273_L1-NL
 MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNLNTYLHWYLQKPGQ
 SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-134), Vùng cố định (135-239)

Fig. 48

SEQ ID NO: 69: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1-NE
 atgaaacacctgtggtttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacgaggacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcgaggataccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctactacttgcacagcggcggctacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtagaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttcttcccc
 ccaaaaccaaggaacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggtggaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaagggtcttatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 70: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kiểu hB273_H2-1-NE
 MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPYNEDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 49

SEQ ID NO: 75: Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ conatumumab

atggtgctgcagacccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgaaatcg
 tgttgacacagagtcccggcactcttagccttagcccgggtgaacgcgccaccctgtcctgccgcgc
 ctctcaggggaatctctcgctcttacctcgctggtaccagcagaaacccggccaggccccagtttg
 ctgatatacgggtgcctctagccgagcaactggcatcccagaccggttctcaggatctggctccggga
 ctgacttcactctgaccatctccagactggagcccaggatttcgcggtatattactgccagcagtt
 cggcagcagtccttgaccttcggacaggggtactaaggtggagattaaacgtacgggtggccgcccc
 tccgtgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgcctccgtggtgtgcctgc
 tgaataacttctacccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagtcgggaa
 ctcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctgacc
 ctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccaggggcctgagct
 ccccgctcaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-390), Vùng cố định (400-705)

SEQ ID NO: 76: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ conatumumab

MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQAPSL
 LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-130), Vùng cố định (131-235)

Fig. 50

SEQ ID NO: 77: Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng conatumumab

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
ttcaggaaagcgggcccggcctcgtgaagccctcccagaccctgtctcttacttgtagtgagcgg
tggcagcatttcttcaggcgattacttctggagttggattcgccaactgcctggtaaagggctggaa
tggatcgggcatattcacaattcaggaaccacatattataacccttactgaagagccgggtaacta
tctccgttgacactagcaagaacagttctccctccggctgtcttctgtcacagccgctgacaccgc
tgtttactactgtgcaagagatcgggggtggcgactactattacggcatggatgtttggggacagga
accaccgtaacagttagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
cgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatct
gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtagaaa
aactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtccttcttctcccc
ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
aaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatccccggga
ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
gtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
acggctccttcttctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
ggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-423), Vùng cố định (424-1413)

SEQ ID NO: 78: Trình tự axit amin của chuỗi nặng conatumumab

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLE
WIGHIHNSGTTYNP SLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGDYYGMDVWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-141), Vùng cố định (142-471)

Fig. 51

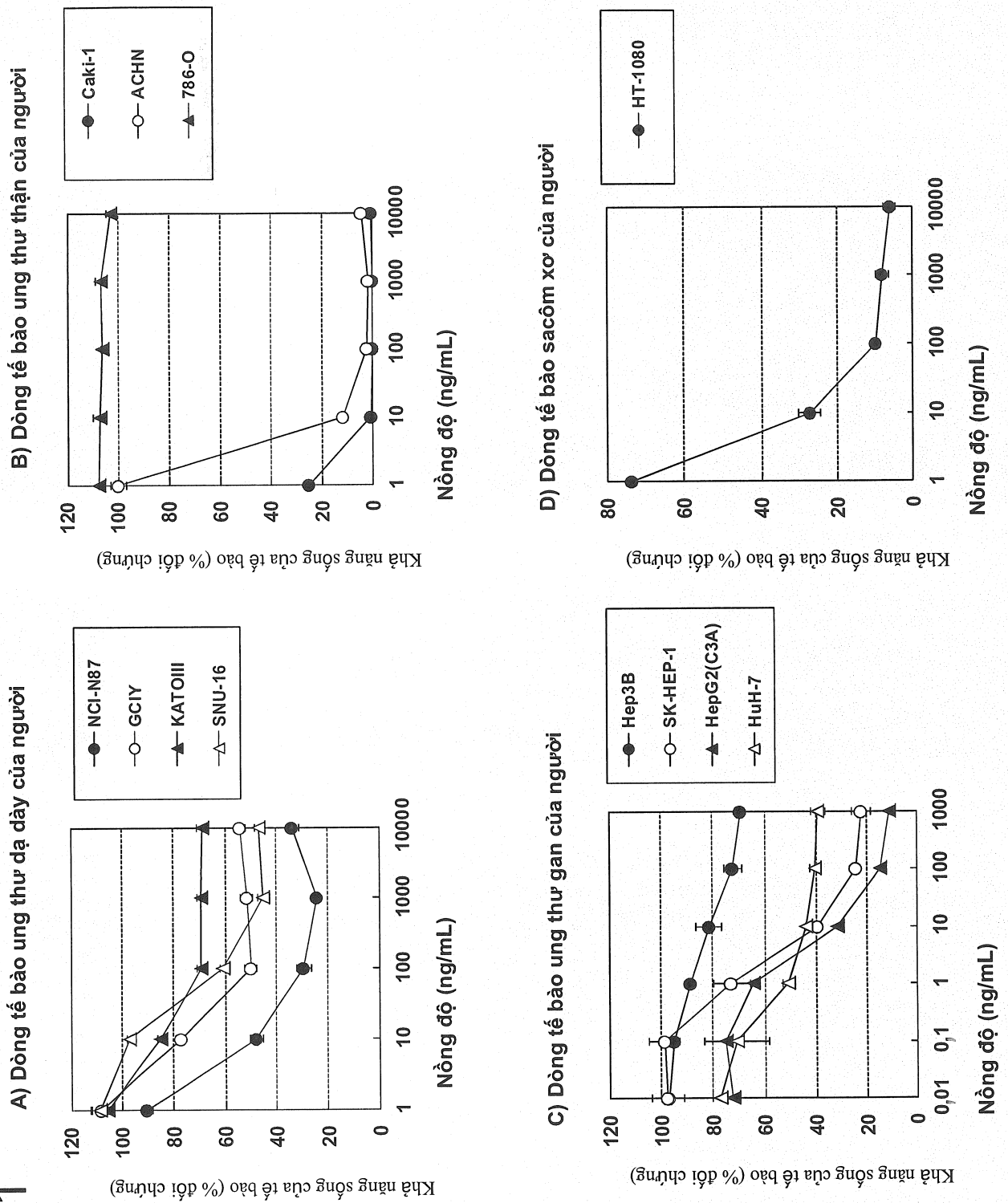


Fig. 52

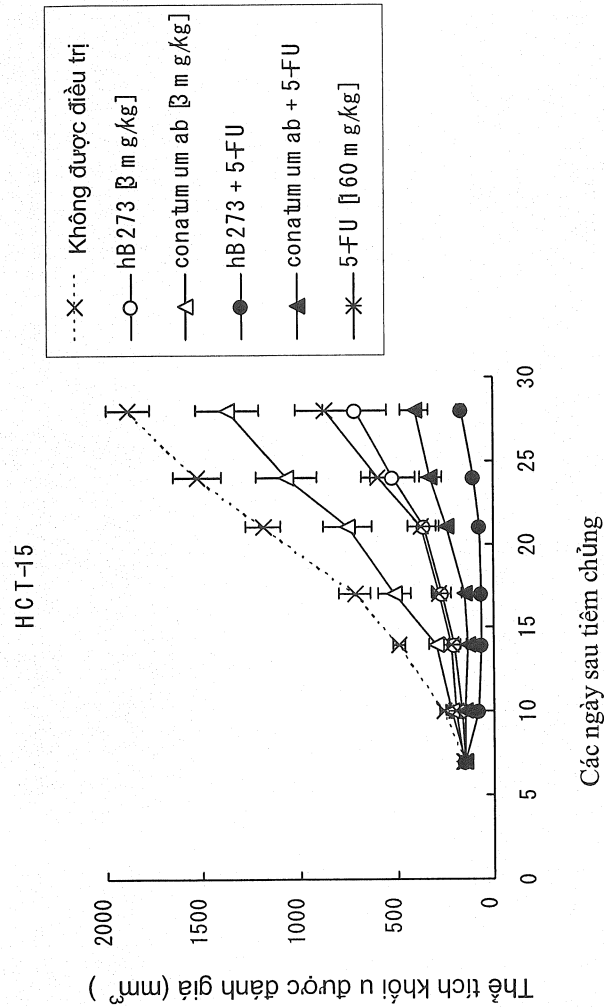


Fig. 53

