



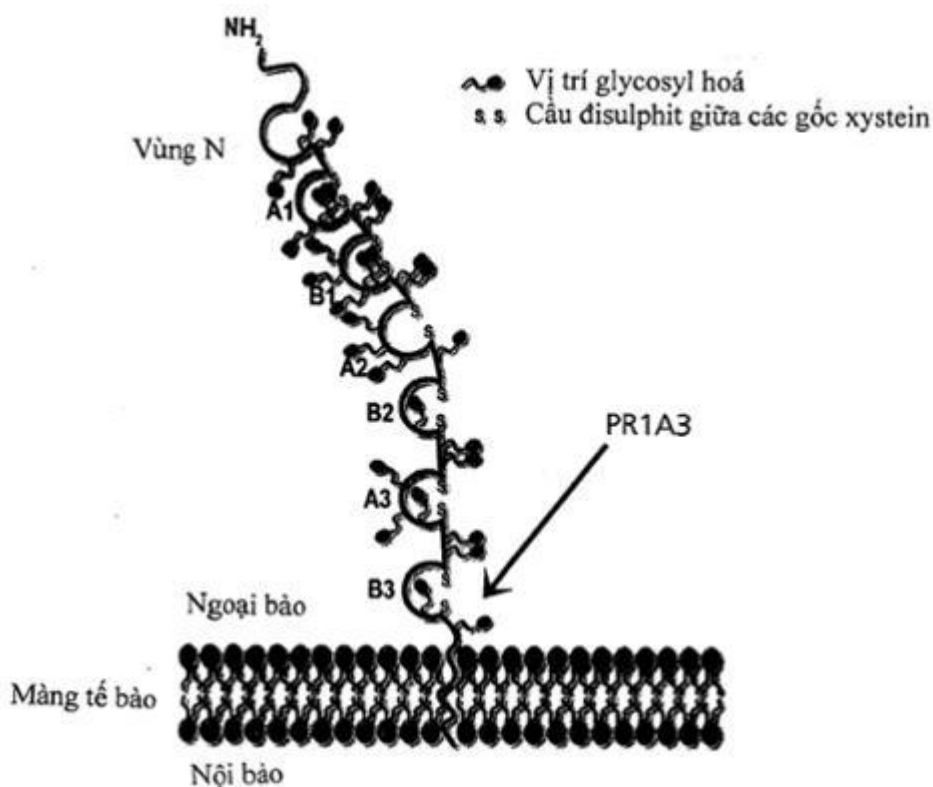
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C07K 14/55; C12N 15/26; A61K 39/395; A61K 47/48 (13) B



(21) 1-2013-03088 (22) 29/02/2012
(86) PCT/EP2012/053390 29/02/2012 (87) WO2012/117002 07/09/2012
(30) 11156665.9 02/03/2011 EP
(45) 27/07/2020 388 (43) 26/05/2014 314A
(73) ROCHE GLYCART AG (CH)
Wagistrasse 18 CH-8952 Schlieren (CH)
(72) HOFER, Thomas U. (CH); HOSSE, Ralf (DE); MOESSNER, Ekkehard (DE);
UMANA, Pablo (CR).
(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ PHÔI GẮN KẾT MÀNG VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế liên quan đến các phân tử gắn kết kháng nguyên (ABMs) mà chúng gắn kết với CEA gắn kết màng, bao gồm ABMs có các đặc tính chữa bệnh được cải thiện, cụ thể là kháng thể phân lập gắn kết kháng nguyên ung thư phôi gắn kết màng. Ngoài ra, sáng chế còn liên quan đến chế phẩm chứa kháng thể nêu trên.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên (ABMs). Theo các phương án đặc biệt, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp gắn kết với kháng nguyên ung thư phôi người (CEA).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng nguyên ung thư phôi (CEA) và các kháng thể kháng CEA

Kháng nguyên ung thư phôi (CEA, còn được biết là CEACAM-5 hoặc CD66e) là glycoprotein có phân tử lượng khoảng 180kDa. CEA là thành viên của siêu họ globulin miễn dịch và chứa bảy miền được liên kết với màng tế bào nhờ neo glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Thompson J.A., *J Clin Lab Anal.* 5:344–366, 1991). Bảy miền bao gồm miền biến đổi Ig đầu tận cùng N đơn và sáu miền (A1-B1-A2-B2-A3-B3) tương đồng với miền ổn định Ig (Hefta L J, và các đồng tác giả, *Cancer Res.* 52:5647-5655, 1992).

Họ CEA người chứa 29 gen, trong đó 18 gen được biểu hiện: 7 gen thuộc về nhóm phụ CEA và 11 gen thuộc về nhóm phụ glycoprotein đặc hiệu với thai kỳ. Một vài thành viên nhóm phụ CEA được cho là có các đặc tính dính bám tế bào. CEA được cho là có vai trò trong miễn dịch bẩm sinh (Hammarström S., *Semin Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999)). Do sự tồn tại của các protein liên quan chặt chẽ với CEA, nên nó có thể kích thích gia tăng các kháng thể kháng CEA mà đặc hiệu đối với CEA có tính phản ứng chéo tối thiểu với các protein liên quan chặt chẽ khác.

CEA từ lâu đã được nhận biết là kháng nguyên kết hợp ung thư (Gold và Freedman, *J Exp Med.*, 121:439–462, 1965; Berinstein N. L., *J Clin Oncol.*, 20:2197–2207, 2002). Trước tiên được phân loại là protein chỉ biểu hiện ở mô thai,

ngày nay CEA được nhận dạng ở một vài mô trường thành bình thường. Các mô đó chủ yếu có nguồn gốc biểu mô, bao gồm các tế bào của các đường dạ dày-ruột, hô hấp, và niệu-sinh dục, và các tế bào của ruột kết, cổ tử cung, các tuyến mô hôi, và tuyến tiền liệt (Nap và các đồng tác giả, *Tumour Biol.*, 9(2-3):145-53, 1988; Nap và các đồng tác giả, *Cancer Res.*, 52(8):2329-2333, 1992).

Các khối u có nguồn gốc biểu mô, cũng như các di căn của chúng, chứa CEA như kháng nguyên kết hợp ung thư. Trong khi sự có mặt của chính CEA không biểu thị sự biến dạng thành tế bào ung thư, thì sự phân bố của CEA lại biểu thị. Trong mô bình thường, CEA thường được biểu hiện trên mặt đỉnh của tế bào (Hammarström S., *Semin Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999)), nên nó không thể tiếp cận được với kháng thể trong dòng máu. Trái ngược với mô bình thường, CEA có xu hướng biểu hiện trên toàn bộ bề mặt của các tế bào ung thư (Hammarström S., *Semin Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999)). Sự thay đổi này của kiểu biểu hiện làm cho CEA có thể tiếp cận được với gắn kết kháng thể trong các tế bào ung thư. Ngoài ra, việc biểu hiện CEA gia tăng trong các tế bào ung thư. Hơn nữa, việc biểu hiện CEA tăng lên thúc đẩy sự dính bám gian bào tăng, điều này có thể dẫn đến sự di căn (Marshall J., *Semin Oncol.*, 30(a Suppl. 8):30-6, 2003).

CEA dễ dàng tách khỏi bề mặt tế bào và chảy vào dòng máu xuất phát từ các khối u, hoặc trực tiếp hoặc qua các mạch bạch huyết. Do đặc tính này, lượng CEA trong huyết thanh được sử dụng làm chỉ số lâm sàng để chẩn đoán các bệnh ung thư và sàng lọc về sự tái phát của các bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư ruột kết (Goldenberg D M., *The International Journal of Biological Markers*, 7:183-188, 1992; Chau I., và các đồng tác giả, *J Clin Oncol.*, 22:1420-1429, 2004; Flamini và các đồng tác giả, *Clin Cancer Res*; 12(23):6985-6988, 2006). Đặc tính này cũng thể hiện một trong các thách thức để sử dụng CEA làm đích, do CEA trong huyết thanh gắn kết với phần lớn các kháng thể kháng CEA hiện tại có thể dùng được, cản trở không cho chúng tiếp cận với đích của chúng trên bề mặt tế bào và hạn chế các tác dụng lâm sàng hiệu nghiệm.

Nhiều kháng thể đơn dòng được đề xuất kháng CEA cho các mục đích nghiên cứu, làm các công cụ chẩn đoán, và cho các mục đích chữa bệnh (ví dụ Nap và các đồng tác giả, *Cancer Res.*, 52(8):2329-23339, 1992; Sheahan và các đồng tác giả, *Am. J. Clin. Path.* 94:157-164, 1990; Sakurai và các đồng tác giả, *J. Surg. Oncol.*, 42:39-46, 1989; Goldenberg D M., *The International Journal of Biological Markers*, 7:183-188, 1992; Ledermann J A, *Br. J. Cancer*, 58:654, 1988; Ledermann J A, *Br. J. Cancer*, 68:69-73, 1993; Pedley R B, và các đồng tác giả, *Br. J. Cancer*, 68:69-73, 1993; Boxer GM, và các đồng tác giả, *Br. J. Cancer*, 65:825-831, 1992). Chester và các đồng tác giả đã phân lập kháng thể kháng CEA chuỗi đơn từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn để được sử dụng trong việc phát hiện miễn dịch phóng xạ và liệu pháp miễn dịch phóng xạ (Patent Mỹ số 5,876,691), và sau đó kháng thể được làm giống như của người (Patent Mỹ số 7,232,888). Các kháng thể kháng CEA cũng được phân lập từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn người (Patent Mỹ số 5,872,215).

Kháng thể đơn dòng chuột nhắt PR1A3 được tạo ra bằng cách dung hợp các tế bào u tuỷ NS1 (P3/NS1/I-Ag-4-1) với các tế bào lách của chuột nhắt được tạo miễn dịch bằng biểu mô ruột kết trực tràng bình thường (Richman P. I. và Bodmer W. F., *Int. J. Cancer*, 39:317-328, 1987). PR1A3 phản ứng mạnh với cả caxinom ruột kết trực tràng biệt hoá tốt và kém và có các ưu điểm đối với các kháng thể phản ứng với biểu mô ruột kết trực tràng khác do kháng nguyên của nó dường như được cố định ở khối u và không xuất hiện ở các mạch bạch huyết hoặc các hạch bạch huyết bình thường làm tiêu khối u (Granowska M. và các đồng tác giả, *Eur. J. Nucl. Med.*, 20:690-698, 1989). Ví dụ, PR1A3 phản ứng với 59/60 khối u ruột kết trực tràng (Richman P. I. và Bodmer W. F., *Int. J. Cancer*, 39:317-328, 1987), trong khi kháng thể có hoạt tính mạnh với CEA B72.3 phản ứng với chỉ 75% các khối u ruột kết trực tràng (Mansi L., và các đồng tác giả, *Int J Rad Appl Instrum B.*, 16(2):127-35, 1989).

Việc lập bản đồ epitop của PR1A3 chứng tỏ rằng kháng thể nhắm vào miền B3 và neo GPI của phân tử CEA (Durbin H. và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4313-4317, 1994). Do đó, kháng thể PR1A3 chỉ gắn kết với CEA liên kết màng, và không gắn kết với dạng CEA tan được mà có thể được thấy trong các dòng máu của các bệnh nhân ung thư. Do đặc tính gắn kết này, kháng thể PR1A3 không chắc được cô lập bởi CEA trong huyết thanh; để thay thế, nó có thể nhắm vào CEA được biểu hiện trên các tế bào ung thư. Epitop liên kết bởi PR1A3 là epitop cấu dạng, không phải là epitop tuyến tính, nó được cho là góp phần làm suy giảm gắn kết của PR1A3 với CEA tan được (Stewart và các đồng tác giả, *Cancer Immunol Immunother*, 47:299-06, 1999).

Kháng thể PR1A3 được làm giống như của người trước đó bằng cách ghép các CDR của kháng thể chuột gốc với các vùng khung chuỗi nặng 1-3 của kháng thể người RF-TS3'CL (duy trì khung chuỗi 4 của PR1A3) và các vùng khung chuỗi nhẹ của kháng thể REI (Stewart và các đồng tác giả, *Cancer Immunol Immunother*, 47:299-06, 1999). Kiểu được làm giống như của người của PR1A3 giữ được tính đặc hiệu và đối với CEA biểu hiện bề mặt có ái lực tương tự với ái lực của kháng thể chuột (Stewart và các đồng tác giả, *Cancer Immunol Immunother*, 47:299-06, 1999; Patent Mỹ số 5,965,710). Kháng thể PR1A3 được làm giống như của người (hPR1A3) được biết là có thể kích thích việc giết các dòng tế bào ung thư ruột kết đích (Conaghghan P. J., và các đồng tác giả, *Br. J. Cancer*, 98(7):1217-1225). Tuy nhiên, ái lực của hPR1A3 đối với CEA là tương đối thấp.

Các kháng thể kháng CEA đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng ở các bệnh nhân bị bệnh ung thư ruột kết. Ví dụ, mảnh kháng thể minime thể khảm đánh dấu ^{123}I T84.66 (cT84.66) được sử dụng trong thử nghiệm lâm sàng thí điểm ở các bệnh nhân bị bệnh ung thư ruột kết. Mảnh kháng thể minime đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ có khả năng nhắm vào các tế bào ung thư. (Wong J. Y. và các đồng tác giả, *Clin Cancer Res*. 10(15):5014-21, (2004)). Trong một ví dụ khác, kháng thể kháng CEA được làm giống như của

người đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, ^{131}I -labetuzumab, được thử nghiệm trong liệu pháp miễn dịch phóng xạ phụ trợ ở các bệnh nhân bị bệnh ung thư ruột kết di căn, và được thấy tạo ra lợi ích sống sót đầy triển vọng (Liersch T., và các đồng tác giả, *Ann. Surg. Oncol.* 14(9):2577-90, (2007)).

Quá trình glycosyl hóa kháng thể

Thành phần oligosacarit có thể tác động đáng kể đến các đặc tính có liên quan đến hiệu quả của glycoprotein chữa bệnh, bao gồm tính ổn định vật lý, khả năng chống lại sự ăn mòn proteaza, các tương tác với hệ miễn dịch, các dược động lực, và hoạt tính sinh học đặc hiệu. Các đặc tính này có thể phụ thuộc không chỉ vào sự có mặt hoặc vắng mặt, mà còn phụ thuộc vào các cấu trúc đặc hiệu của các oligosacarit. Một số khái quát hóa giữa cấu trúc oligosacarit và chức năng của glycoprotein có thể được tiến hành. Ví dụ, một vài oligosacarit cấu trúc tạo ra sự thanh thải nhanh của glycoprotein khỏi dòng máu nhờ các tương tác với các protein gắn kết hydrat cacbon đặc hiệu, trong khi các loại khác có thể được gắn kết bởi các kháng thể và kích thích các phản ứng miễn dịch không mong muốn (Jenkins và các đồng tác giả, *Nature Biotechnol.* 14:975-81, 1996).

Các tế bào động vật có vú là các vật chủ được ưu tiên để tạo ra các glycoprotein chữa bệnh nhờ khả năng của chúng có thể glycosyl hóa các protein trong dạng tương thích nhất cho ứng dụng ở người (Cumming và các đồng tác giả, *Glycobiology* 1:115-30, 1991; Jenkins và các đồng tác giả, *Nature Biotechnol.* 14:975-981, 1996). Vi khuẩn rất ít khi glycosyl hóa các protein và, tương tự các loại vật chủ thông thường khác, như nấm men, nấm dạng sợi, các tế bào côn trùng và thực vật, tạo ra các dạng glycosyl hóa có liên quan đến sự thanh thải nhanh khỏi dòng máu, các tương tác miễn dịch không muốn, và trong một số trường hợp đặc biệt, hoạt tính sinh học giảm. Trong số các tế bào động vật có vú, các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) thường được sử dụng nhất trong hai thập kỷ qua. Ngoài tạo ra các dạng glycosyl hóa thích hợp, các tế bào chấp nhận sự hình

thành phù hợp của các dòng tế bào vô tính có khả năng sinh sản cao, ổn định về mặt di truyền. Chúng có thể được nuôi cấy với các mật độ cao trong các bình phản ứng sinh học nhờ sử dụng môi trường không có huyết thanh, và cho phép phát triển các quá trình sinh học lặp lại được và an toàn. Các tế bào động vật thường sử dụng khác bao gồm các tế bào thận chuột đồng non (BHK), các tế bào u tủy chuột nhắt NS0 và SP2/0. Mới đây, quá trình sản sinh từ động vật chuyển gen cũng được thử nghiệm (Jenkins và các đồng tác giả, *Nature Biotechnol.* 14:975-81, 1996).

Tất cả các kháng thể chứa các cấu trúc hydrat cacbon tại các vị trí bảo toàn ở các vùng ổn định chuỗi nặng, với mỗi isotyp có chuỗi riêng biệt gồm các cấu trúc hydrat cacbon liên kết N, chúng tác động biến đổi tới tập hợp protein, hoạt tính tiết xuất hoặc chức (Wright A. và Morrison S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32, 1997). Cấu trúc của hydrat cacbon liên kết tại N gắn kết thay đổi một cách đáng kể, tùy thuộc vào mức độ xử lý, và có thể bao gồm mannoza cao, các oligosacarit phức hệ hai râu cũng như đa nhánh (Wright, A., và Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32, 1997). Thông thường, có quy trình xử lý không đồng nhất các cấu trúc oligosacarit nhân gắn kết tại điểm glycosyl hóa đặc biệt đến mức ngay cả các kháng thể đơn dòng cũng tồn tại như một tập hợp của nhiều dạng glycogen. Cũng vậy, đã chứng minh được rằng có các khác biệt chính trong quá trình glycosyl hóa kháng thể xuất hiện giữa các dòng tế bào, và ngay cả các khác biệt thậm chí rất nhỏ được thấy đối với dòng tế bào đã cho được sinh trưởng trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau (Lifely, M. R. và các đồng tác giả, *Glycobiology* 5(8):813-22, 1995).

Một cách để thu được sự gia tăng lớn về hiệu lực, trong khi vẫn duy trì được quá trình sản xuất đơn giản và tránh một cách hiệu quả các tác dụng phụ không mong muốn, đáng kể, là tăng cường các chức năng tác động tự nhiên do tế bào tạo ra của các kháng thể đơn dòng bằng cách biến đổi di truyền thành phần oligosacarit của chúng như được mô tả trong tài liệu Umaña, P. và các đồng tác giả, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999) và Patent Mỹ số 6602684, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các kháng thể loại IgG1, các kháng thể

thường được sử dụng nhất trong liệu pháp miễn dịch ung thư, là các glycoprotein mà có vị trí glycosyl hóa liên kết N bảo toàn tại Asn297 ở mỗi miền CH2. Hai oligosacarit phức hệ hai râu gắn kết với Asn297 bị vùi giữa các miền CH2, tạo ra các tiếp xúc rộng rãi với khung chính polypeptit, và sự có mặt của chúng là cần thiết đối với kháng thể để tạo ra các chức năng tác động như độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Lifely, M. R., và các đồng tác giả, *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., và các đồng tác giả, *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. và Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

Umaña và các đồng tác giả trước đó đã cho thấy rằng việc biểu hiện quá mức $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III ("GnTIII"), glycosyltransferaza xúc tác quá trình hình thành của các oligosacarit cắt đôi, trong các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) làm tăng đáng kể hoạt tính ADCC *in vitro* của kháng thể đơn dòng thể khảm chống u nguyên bào thần kinh (chCE7) được tạo ra bởi các tế bào CHO đã được biến đổi di truyền (Xem tài liệu Umaña, P. và các đồng tác giả, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999); và công bố đơn quốc tế số WO 99/54342, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Kháng thể chCE7 thuộc nhóm lớn của các mAb không tiếp hợp mà có ái lực và tính đặc hiệu khối u cao, nhưng có hiệu lực quá ít để sử dụng lâm sàng khi được tạo ra trong các dòng tế bào công nghiệp chuẩn thiếu enzym GnTIII (Umana, P., và các đồng tác giả, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Nghiên cứu đó trước tiên chứng tỏ rằng các gia tăng lớn về hoạt tính ADCC có thể đạt được bằng cách biến đổi di truyền các tế bào tạo kháng thể để biểu hiện GnTIII, chúng cũng làm gia tăng tỷ lệ giữa các oligosacarit cắt đôi, liên quan đến vùng ổn định (Fc) kể cả các oligosacarit cắt đôi, không fucosyl hóa, cao hơn các mức đã thấy trong các kháng thể xuất hiện tự nhiên.

Vẫn cần thiết có các phương pháp chữa bệnh tăng cường nhằm vào CEA, đặc biệt là CEA liên kết màng để điều trị các bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập gắn kết với CEA liên kết màng, trong đó kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 của SEQ ID NO:1, chuỗi nặng CDR2 của SEQ ID NO:13, chuỗi nặng CDR3 của SEQ ID NO:223, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 của SEQ ID NO:39, chuỗi nhẹ CDR2 của SEQ ID NO:49, và chuỗi nhẹ CDR3 của SEQ ID NO:56.

Theo một phương án, kháng thể gắn kết CEA liên kết màng tại Kd là 100nM hoặc thấp hơn. Theo một phương án, kháng thể gắn kết CEA liên kết màng tại Kd là 10nM hoặc thấp hơn. Theo một phương án, kháng thể gắn kết CEA liên kết màng tại Kd là 1nM hoặc thấp hơn.

Theo một phương án nữa, kháng thể bao gồm các gốc vùng khung là CH1A1A (SEQ ID NO: 261) hoặc CH1A1B (SEQ ID NO: 262). Theo một phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 239 và SEQ ID NO: 247 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 209.

Theo các phương án đã biết, kháng thể của các phương án nêu trên gắn kết với cùng epitop như, hoặc có thể cạnh tranh để gắn kết với kháng thể đơn dòng chuột PR1A3.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm vùng Fc mà được biến đổi di truyền bằng glycogen. Theo một phương án, ít nhất khoảng từ 20% đến 100% oligosacarit liên kết tại N ở vùng Fc của kháng thể được biến đổi di truyền bằng glycogen không được fucosyl hóa. Theo một phương án, ít nhất khoảng 20% đến 100% oligosacarit liên kết tại N ở vùng Fc được biến đổi di truyền bằng glycogen được cắt đôi. Theo một phương án, trong đó ít nhất khoảng 20% đến 50% oligosacarit liên kết tại N ở vùng Fc được biến đổi di truyền bằng glycogen được cắt đôi, không được fucosyl hóa. Theo một phương án, kháng thể bao gồm vùng Fc được biến đổi di truyền bằng glycogen có ít nhất một chức năng tác động tăng. Theo một phương

án, chức năng tác động tăng được chọn từ nhóm bao gồm ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng, độc tính tế bào trung gian kháng thể tăng (ADCC), gắn kết tăng với các tế bào NK, gắn kết với các đại thực bào tăng, gắn kết với các bạch cầu đơn nhân tăng, gắn kết với các bạch cầu hạt tăng, truyền tín hiệu trực tiếp kích thích sự chết theo chương trình tăng, quá trình trưởng thành tế bào tua tăng, và miễn cảm sơ bộ tế bào T tăng chẳng hạn. Theo một phương án, kháng thể được biến đổi di truyền bằng glycogen có sự gia tăng ADCC từ ít nhất khoảng 40% đến 100% so với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc được biến đổi di truyền bằng glycogen.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập mã hóa kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án mô tả ở trên. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật truyền bao gồm polynucleotit mã hoá ABM hoặc kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án mô tả ở trên. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm vật truyền này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án mô tả ở trên và chất mang được dùng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cung cấp chế phẩm bao gồm kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án mô tả ở trên dùng trong điều trị cho đối tượng bị ung thư mà biểu hiện bất thường CEA. Theo một phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư ruột kết trực tràng, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy hoặc bệnh ung thư vú.

Theo các phương án đã biết, kháng thể hoặc chế phẩm được cung cấp kết hợp với hoá liệu pháp hoặc liệu pháp bức xạ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện biểu đồ của kháng nguyên CEA (CEACAM-5, CD66e). Kháng thể PR1A3 gắn kết đặc hiệu với miền B3 của kháng nguyên khi nó liên kết với màng tế bào.

Fig.2 thể hiện hoạt tính ADCC được tăng cường của kháng thể thể khảm PR1A3 được biến đổi di truyền bằng glycogen với các PBMC người làm các chất tác động.

Fig.3 thể hiện hoạt tính gắn kết kháng nguyên của kháng thể PR1A3 được làm giống như của người bao gồm cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nặng, CH7A, và cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nhẹ, CL1A, so với kháng thể PR1A3 thể khảm.

Fig.4 thể hiện các vị trí ngẫu nhiên hoá để tạo ra thư viện kháng thể cho quá trình trưởng thành ái lực của chuỗi nhẹ kháng thể PR1A3 được làm giống như của người. Các vị trí được đánh dấu bằng X được ngẫu nhiên hoá.

Fig.5 thể hiện các vị trí ngẫu nhiên hoá để tạo ra thư viện kháng thể cho quá trình trưởng thành ái lực của chuỗi nặng kháng thể PR1A3 được làm giống như của người. Các vị trí được đánh dấu bằng X được ngẫu nhiên hoá.

Fig.6 thể hiện hoạt tính gắn kết của các kháng thể kháng CEA có ái lực hoàn thiện thu được từ kháng thể PR1A3 được làm giống như của người bao gồm cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nặng CH7ArF9 và cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nhẹ CL1ArH11.

Fig.7 thể hiện các kết quả của thử nghiệm hiệu lực ở chuột nhắt SCID/bg mà được sử dụng trong lách các tế bào caxinom ruột kết trực tràng người LS174T để có mẫu khối u đúng vị trí. Liệu pháp kháng thể được bắt đầu vào 7 ngày sau khi tiêm các kháng thể với liều 25mg/kg trọng lượng cơ thể, tiếp theo là hai lần tiêm bổ sung mỗi tuần. "CH7A" là kháng thể được làm giống như của người bao gồm các CDR của PR1A3 như được mô tả ở đây. "SM3E" đề cập đến kháng thể kháng CEA phát sinh trước đó. "GA201" là kháng thể kháng EGF được làm giống như của người được sử dụng làm đối chứng dương. "PBS" đề cập đến nước muối đệm phosphat, được sử dụng làm đối chứng âm. Tỷ lệ sống được xác định theo các tiêu chuẩn kết thúc được xác định bởi cơ quan có thẩm quyền của Thụy Sĩ.

Fig.8 thể hiện các kết quả của thử nghiệm hiệu lực ở chuột nhắt SCID/bg được tiêm trong tĩnh mạch các tế bào caxinom phổi A549, trong đó khối u ghép trong phổi con vật. Liệu pháp kháng thể được bắt đầu vào 7 ngày sau khi tiêm các kháng thể với liều 25mg/kg trọng lượng cơ thể, tiếp theo là hai lần tiêm bổ sung mỗi tuần. "CH7A," "SM3E," và "GA201" như đã nêu đối với FIG.7, ở trên. Ký hiệu "CH7ArF9 CL1A rH11" là thể biến dị kháng thể CH7A với các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ có ái lực hoàn thiện. Ký hiệu "ge" biểu thị rằng kháng thể được biến đổi di truyền bằng glycogen để có số lượng các oligosacarit fucosyl hoá giảm ở vùng Fc. "Chất dẫn" đề cập đến đối chứng âm. Các tế bào caxinom phổi A549 dương tính mạnh đối với biểu hiện EGFR và dương tính yếu đối với biểu hiện CEA.

Fig.9 thể hiện các kết quả của thử nghiệm hiệu lực ở chuột nhắt SCID/bg mà được sử dụng trong lách các tế bào caxinom dạ dày MKN45, chúng gây ra sự di căn khối u trong gan con vật. Các ký hiệu "CH7ArF9 CL1A rH11," "SM3E," "ge," và "PBS" được nêu trong các Fig.7 và Fig.8 ở trên.

Fig.10 thể hiện phân tích động lực của các dòng vô tính có ái lực hoàn thiện: (a) thể hiện biểu đồ của các đáp ứng so với thời gian trong các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt của các Fab kháng CEA với chuỗi nặng có ái lực hoàn thiện CH7A H4E9 (SEQ ID NO: 199) cùng với chuỗi nhẹ có ái lực không hoàn thiện CL1A (SEQ ID NO:105); chuỗi nhẹ có ái lực hoàn thiện CL1A pAC18 (SEQ ID NO:209) kết hợp với chuỗi nặng ái lực không hoàn thiện CH7A; và tổ hợp của chúng, CH7A H4E9 và CL1A pAC18 (các SEQ ID NO:199 và 209); (b) bản tóm tắt phân tích động lực các dòng vô tính có ái lực hoàn thiện.

Fig.11 thể hiện sơ đồ tổng quan về phương pháp PCR để ngẫu nhiên hoá CDR1 và CDR2 của chuỗi nặng kháng thể kháng CEA được làm giống như của người CH7A .

Fig.12 thể hiện sơ đồ tổng quan về phương pháp PCR để ngẫu nhiên hoá CDR1 và CDR2 của chuỗi nhẹ kháng thể kháng CEA được làm giống như của người CL1A.

Fig.13 thể hiện sơ đồ tổng quan về phương pháp PCR để ngẫu nhiên hoá CDR3 của chuỗi nặng kháng thể kháng CEA được làm giống như của người CH7A.

Fig.14 thể hiện sơ đồ tổng quan về phương pháp PCR để ngẫu nhiên hoá CDR3 của chuỗi nhẹ kháng thể kháng CEA được làm giống như của người CL1A.

Fig.15 thể hiện ái lực gắn kết của các kháng thể kháng CEA đối với CEA liên kết màng trên các tế bào đích MKN45. Các kháng thể kháng CEA được làm giống như của người với hoặc chuỗi nhẹ có ái lực hoàn thiện (Cột A, CH7A,CL1ArH7 hoặc CH7A,CL1ArH11) hoặc các chuỗi nặng và nhẹ có ái lực hoàn thiện (Cột B, CH7A rB9, CL1A rH11 G2(1)) mà được chuyển hoá thành IgG thể hiện gắn kết cải thiện như so với kháng thể đối chứng (CH7A,CL1A).

Fig.16 thể hiện các kết quả của thử nghiệm kiểm tra độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) bằng các kháng thể có ái lực hoàn thiện (CH7ArB9, CL1A rH11G2(1), CH7Arf9, CL1A rH11G2(1), và CH7A, CL1A rH11 G2(1)) so với các kháng thể đối chứng (CH7A, CL1A G2(R2)).

Fig.17 thể hiện các kết quả của thử nghiệm gắn kết tế bào đối với kháng thể kháng CEA với chuỗi nặng CH1A như so với kháng thể thể khảm chuột-người chPR1A3.

Fig.18 thể hiện các kết quả của thử nghiệm gắn kết đối với các kháng thể kháng CEA với chuỗi nặng CH1A1, CH1A2, CH1A3, hoặc CH1A4 và chuỗi nhẹ 2F1.

Fig.19 thể hiện các kết quả của thử nghiệm tính ổn định đối với các kháng thể kháng CEA với chuỗi nặng CH1A1, CH1A2, CH1A3, hoặc CH1A4.

Fig.20 thể hiện các kết quả của phép phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) đối với các kháng thể kháng CEA phát sinh từ CH1A1.

Fig.21 thể hiện kết quả của các thử nghiệm gắn kết tế bào đối với các kháng thể kháng CEA phát sinh từ CH1A1.

Fig.22 thể hiện các phép đo cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ái lực (như được xác định dưới dạng lưỡng trị) của các kháng thể kháng CEA được biến đổi di truyền ổn định như so với chuỗi nặng 5HFF12 gốc.

Các Fig.23 và Fig.24 thể hiện các kết quả của thử nghiệm tính ổn định đối với kháng thể 5HFF12 có ái lực trưởng thành so với chuỗi nặng gốc của chúng CH7A với các đột biến điểm riêng biệt được đưa vào mà nó được chọn lọc ở 5HFF12.

Fig.25 thể hiện phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt của các thể biến dị và khung kết hợp CDR-H3.

Fig.26 thể hiện hoạt tính ADCC của các thể biến dị khung gốc CHA1A.

Fig.27 thể hiện hoạt tính ADCC của các thể biến dị khung gốc CHA1A.

Fig.28 thể hiện hoạt tính ADCC của các thể biến dị và khung kết hợp CDR-H3.

Fig.29 thể hiện hoạt tính ADCC của các thể biến dị và khung kết hợp CDR-H3.

Fig.30 thể hiện hiệu lực của kháng thể kháng CEA biến đổi di truyền bằng glycogen CH1A1A (Y98A/D99Y) x 2F1 đối với kiểu ghép khác loài ung thư biểu mô ruột kết trực tràng ở chuột SCID biến đổi gen cho CD16 người.

Fig.31 thể hiện hiệu lực của kháng thể kháng CEA biến đổi di truyền bằng glycogen CH1A1A (Y98A/D99Y) x 2F1 đối với kiểu ghép khác loài ung thư biểu mô phổi A549 ở chuột SCID biến đổi gen cho CD16 người.

Fig.32 thể hiện các trình tự axit amin của CDRs đối với các ABM kháng CEA khác nhau.

Fig.33 thể hiện các trình tự axit amin của các cấu trúc chuỗi nhẹ đối với các ABM kháng CEA khác nhau.

Fig.34A-C thể hiện các trình tự axit amin của các chuỗi nhẹ và nặng có ái lực hoàn thiện CDR và các ái lực gắn kết liên quan.

Fig.35 thể hiện các hằng số ái lực của các trình tự kháng thể có ái lực hoàn thiện khác nhau.

Fig.36 thể hiện các trình tự axit amin của CDR-H3 của các ABM kháng CEA khác nhau.

Fig.37A-C thể hiện các trình tự axit amin của các vùng VH của các ABM kháng CEA khác nhau.

Fig.38 thể hiện các thứ tự trình tự axit amin của các vùng VH của các kháng thể kháng CEA.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ được sử dụng ở đây thường sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, trừ khi có được xác định khác như sau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân tử gắn kết kháng nguyên" đề cập theo nghĩa rộng nhất đến phân tử gắn kết đặc hiệu với thể xác định kháng nguyên. Ví dụ không hạn chế về phân tử gắn kết kháng nguyên là kháng thể hoặc mảnh của chúng vẫn có gắn kết đặc hiệu kháng nguyên. Đặc biệt hơn, như được sử dụng ở đây, phân tử gắn kết kháng nguyên mà gắn kết kháng nguyên ung thư phôi người liên kết màng (CEA) là ABM gắn kết đặc hiệu với CEA, đặc biệt hơn là với CEA liên kết bề mặt tế bào hoặc liên kết màng. Bằng cách "gắn kết đặc hiệu" có nghĩa là gắn kết được chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể phân biệt được với các tương tác không đặc hiệu hoặc không mong muốn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" được dự tính bao gồm toàn bộ các phân tử kháng thể, kể cả các kháng thể đơn dòng, đa dòng và đa đặc hiệu (ví dụ đặc hiệu kép), cũng như các mảnh kháng thể có vùng Fc và vẫn có tính đặc hiệu gắn kết, và các protein dung hợp mà bao gồm vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch và vẫn có tính đặc hiệu gắn kết. Cũng bao gồm là các mảnh kháng thể mà vẫn có tính đặc hiệu gắn kết bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các mảnh VH, các mảnh VL, các mảnh Fab, các mảnh F(ab')₂, các mảnh scFv, các mảnh Fv, các mảnh kháng thể minime, các mảnh kháng thể dime, các mảnh kháng thể trime, và các mảnh kháng thể tetrame (xem, ví dụ tài liệu, Hudson và Souriau, *Nature Med.* 9: 129-134 (2003)).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền gắn kết kháng nguyên" đề cập đến một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên mà bao gồm vùng gắn kết đặc hiệu và hỗ trợ cho một phần hoặc toàn bộ kháng nguyên. Trong đó kháng nguyên là lớn, phân tử gắn kết kháng nguyên có thể chỉ gắn kết với phần đặc biệt của kháng nguyên, phần đó là được gọi là epitop. Miền gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bởi một hoặc nhiều miền kháng thể biến đổi chẳng hạn. Tốt hơn là miền gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể (VL) và vùng biến đổi của chuỗi nặng kháng thể (VH).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái lực hoàn thiện" trong phạm vi của các phân tử gắn kết kháng nguyên (ví dụ các kháng thể) đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên mà thu được từ phân tử gắn kết kháng nguyên tham khảo, ví dụ bằng cách tạo đột biến, gắn kết với cùng kháng nguyên, tốt hơn là gắn kết với cùng epitop, như kháng thể tham khảo; và có ái lực đối với kháng nguyên cao hơn ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên tham khảo. Quá trình tạo đột biến ái lực thường bao gồm cải biến một hoặc nhiều gốc axit amin trong một hoặc nhiều CDR của phân tử gắn kết kháng nguyên. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên có ái lực hoàn thiện gắn kết với cùng epitop như phân tử gắn kết kháng nguyên tham khảo ban đầu.

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ "ái lực gắn kết" thường được biểu hiện dưới dạng các hằng số kết hợp hoặc phân ly cân bằng (K_a hoặc K_d tương ứng), chúng lần lượt là các tỷ số thuận nghịch của các hằng số tốc độ phân ly và kết hợp (k_d và k_a tương ứng). Vì vậy, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tốc độ khác nhau, với điều kiện là tỷ số của các hằng số tốc độ vẫn như nhau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vùng Fc" đề cập đến vùng tận cùng C của chuỗi nặng IgG. Mặc dù các ranh giới của vùng Fc của chuỗi nặng IgG có thể thay đổi không đáng kể, thì vùng Fc của chuỗi nặng IgG người thường được xác định kéo dài từ gốc axit amin tại vị trí Cys226 tới đầu tận cùng carboxyl.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch" được dự tính bao gồm các thể biến dị alen xuất hiện tự nhiên của vùng Fc của globulin miễn dịch cũng như các thể biến dị có các biến đổi mà tạo ra các thay thế, bổ sung, hoặc khuyết đoạn nhưng nó không làm giảm về căn bản khả năng của globulin miễn dịch để tạo ra các chức năng tác động (như độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể). Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể được làm khuyết đoạn khỏi đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của vùng Fc của globulin miễn dịch mà không làm thiệt hại đáng kể chức năng sinh học. Các thể biến dị này có thể được chọn lọc theo các nguyên tắc chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để có tác động tối thiểu đối với hoạt tính (Xem ví dụ tài liệu Bowie, J. U. và các đồng tác giả, *Science* 247:1306-10 (1990)).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "CEA liên kết màng người" đề cập đến kháng nguyên ung thư phôi người (CEA) mà được liên kết với phần màng của tế bào hoặc với bề mặt của tế bào, đặc biệt là bề mặt của tế bào u. Thuật ngữ "CEA liên kết màng người" có thể trong một vài trường hợp, đề cập đến CEA mà không liên kết với màng của tế bào nhưng nó được cấu trúc để bảo toàn epitop mà kháng thể PR1A3 gắn kết với nó. Thuật ngữ "CEA tan được" đề cập đến kháng nguyên ung thư phôi không gắn kết với hoặc được tách ra khỏi màng tế bào hoặc bề mặt tế

bào (ví dụ bề mặt tế bào u) và/hoặc thông thường nó không bảo toàn epitop cấu dạng mà được gắn kết bởi kháng thể PR1A3. CEA tan được, có thể được thấy trong dòng máu hoặc bạch huyết của đối tượng bị bệnh ung thư chẳng hạn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "không có tính phản ứng chéo đáng kể với CEA tan được" có nghĩa là phân tử (ví dụ phân tử gắn kết kháng nguyên) không nhận dạng hoặc gắn kết đặc hiệu với CEA tan được, đặc biệt là khi so sánh với CEA liên kết màng. Ví dụ, phân tử gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết với ít hơn khoảng 10% đến ít hơn khoảng 5% CEA tan được, hoặc có thể gắn kết với CEA tan được với lượng được chọn từ nhóm gồm có ít hơn khoảng 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, hoặc 0,1%, tốt hơn là ít hơn khoảng 2%, 1%, hoặc 0,5% CEA tan được, và tốt nhất là ít hơn khoảng 0,2% hoặc 0,1% CEA tan được.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "dung hợp" và "thể khảm" khi được sử dụng liên quan đến các polypeptit như các ABM, đề cập đến các polypeptit bao gồm các trình tự axit amin thu được từ hai hoặc nhiều polypeptit khác loài, như các phần của các kháng thể từ loài khác nhau. Đối với các ABM thể khảm, các thành phần không gắn kết kháng nguyên có thể thu được từ rất nhiều loại, bao gồm động vật linh trưởng như tinh tinh và người. Vùng ổn định của thể khảm ABM về căn bản thường đồng nhất với vùng ổn định của kháng thể tự nhiên người; vùng biến đổi của kháng thể thể khảm thường bao gồm trình tự mà thu được từ kháng thể tái tổ hợp kháng CEA có trình tự axit amin của vùng biến đổi PR1A3 chuột. Các kháng thể được làm giống như của người là dạng ưu tiên đặc biệt của kháng thể dung hợp hoặc thể khảm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được làm giống như của người" được sử dụng để đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên phần nào thu được từ phân tử gắn kết kháng nguyên không phải của người, ví dụ kháng thể chuột mà vẫn có hoặc về căn bản vẫn có các đặc tính gắn kết kháng nguyên của phân tử gốc nhưng ít tạo

miễn dịch ở người. Điều này có thể thực hiện được bằng các phương pháp khác nhau (đề cập tới ở đây là “quá trình được làm giống như của người”) bao gồm, nhưng không giới hạn ở (a) ghép toàn bộ các miền biến đổi không phải của người vào các vùng ổn định của người để tạo ra các kháng thể thể khảm, (b) ghép chỉ các CDR không phải của người (ví dụ phân tử gắn kết kháng nguyên cho) vào các vùng ổn định và khung của người (ví dụ phân tử gắn kết kháng nguyên nhận) có hoặc không giữ các gốc khung quan trọng (ví dụ các gốc khung mà quan trọng để giữ ái lực gắn kết kháng nguyên tốt hoặc các chức năng kháng thể), hoặc (c) ghép toàn bộ các miền biến đổi không phải của người, nhưng "che phủ" chúng bằng phần tương tự của người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Các phương pháp này được thể hiện trong tài liệu Jones và các đồng tác giả, Morrison và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison và Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeven và các đồng tác giả, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994), toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Thường có 3 vùng xác định hỗ trợ, hoặc các CDR, (CDR1, CDR2 và CDR3) ở mỗi trong các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, chúng nằm bên sườn của bốn vùng phụ khung (tức là FR1, FR2, FR3, và FR4) ở mỗi trong các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Thảo luận về các kháng thể được làm giống như của người có thể được thấy, không kể những tài liệu khác, trong patent Mỹ số 6632927, và trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0175269, toàn bộ hai tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Quá trình làm giống như của người có thể thực hiện được bằng cách ghép các CDR đã làm cùn đầu mà chỉ chứa các gốc axit amin xác định tính đặc hiệu cho CDR đã cho vào khung đã chọn. Bằng “các gốc xác định tính đặc hiệu” nghĩa là các gốc mà trực tiếp tham gia vào tương tác đặc hiệu với kháng nguyên và/hoặc cần thiết cho gắn kết đặc hiệu kháng nguyên. Nói chung, chỉ khoảng một phần năm đến một phần ba các gốc trong CDR đã cho tham gia vào gắn kết với kháng nguyên. Các gốc xác định tính đặc hiệu trong CDR đặc biệt có thể được nhận dạng bằng

cách tính toán các tiếp xúc liên nguyên tử từ mô hình hoá ba chiều và xác định độ biến đổi trình tự tại vị trí gốc đã cho theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu Padlan và các đồng tác giả, *FASEB J.* 9(1):133-139 (1995).

Trong một số ví dụ, các gốc vùng khung (FR) của globulin miễn dịch người được thay thế bằng các gốc không phải của người tương ứng. Ngoài ra, các phân tử gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người có thể bao gồm các gốc mà được thấy trong kháng thể nhận hoặc trong kháng thể cho. Các cải biến đó được tạo ra để tinh chế thêm chất lượng phân tử gắn kết kháng nguyên. Nói chung, phân tử gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người sẽ bao gồm về căn bản toàn bộ của ít nhất một, và thông thường là hai miền biến đổi, trong đó ít nhất một, hoặc về căn bản tất cả, hoặc toàn bộ các vùng siêu biến tương ứng với các vùng siêu biến của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc căn bản toàn bộ các FR là các FR của trình tự globulin miễn dịch người. Phân tử gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người tùy ý sẽ còn bao gồm ít nhất một phần của vùng globulin miễn dịch ổn định (Fc), thông thường là một phần của globulin miễn dịch người. Xem, ví dụ tài liệu Jones và các đồng tác giả, *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann và các đồng tác giả, *Nature* 332:323-329 (1988); và Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Tương tự, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được làm giống như của động vật linh trưởng" được sử dụng để đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên thu được từ phân tử gắn kết kháng nguyên không phải của động vật linh trưởng, ví dụ, kháng thể chuột, mà vẫn có hoặc về căn bản vẫn có các đặc tính gắn kết kháng nguyên của phân tử gốc nhưng chúng ít tạo miễn dịch ở động vật linh trưởng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ polynucleotit hoặc polypeptit "dạng biến dị" (hoặc dạng tương đồng) đề cập đến polynucleotit hoặc polypeptit khác với polynucleotit hoặc polypeptit đã nêu cụ thể của sáng chế bởi các xen đoạn, khuyết đoạn, và thay thế, được tạo ra nhờ sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp ADN chẳng hạn.

Đặc biệt, các thể biến dị tái tổ hợp mã hóa các polypeptit giống nhau hoặc tương tự có thể được tổng hợp hoặc chọn lọc bằng cách sử dụng “sự lặp lại” trong mã di truyền. Các thay thế codon khác nhau, như các biến đổi câm tạo ra các điểm giới hạn khác nhau, có thể được đưa vào để tối ưu việc tách dòng vào plasmit hoặc vật truyền virus hoặc biểu hiện trong hệ chưa có nhân điển hình hoặc nhân điển hình đặc biệt. Các đột biến trong trình tự polynucleotit có thể được phản ánh trong polypeptit hoặc các miền của các peptit khác thêm vào polypeptit để làm thay đổi các đặc tính của phần bất kỳ của polypeptit, để chuyển đổi các đặc tính là các ái lực gắn kết phối tử, các ái lực trong chuỗi, hoặc tốc độ quay vòng/thoái biến.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân tử gắn kết kháng nguyên thể biến dị kháng CEA" đề cập đến phân tử khác về trình tự axit amin với trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên “gốc” kháng CEA do xen đoạn, khuyết đoạn và/hoặc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự kháng thể gốc. Theo một phương án đặc biệt, thể biến dị bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vùng siêu biến hoặc các CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Ví dụ, thể biến dị có thể bao gồm ít nhất một, ví dụ khoảng từ một đến mười (tức là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10), và tốt hơn là khoảng từ hai đến khoảng năm thay thế trong một hoặc nhiều vùng siêu biến hoặc các CDR (tức là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 vùng siêu biến hoặc các CDR) của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Phân tử gắn kết kháng nguyên thể biến dị kháng CEA còn có thể bao gồm một hoặc nhiều xen đoạn, khuyết đoạn và/hoặc thay thế trong một hoặc nhiều vùng khung của hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Thông thường, thể biến dị sẽ có trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc, thường ít nhất là khoảng 80%, 90%, 95% hoặc 99%. Độ đồng nhất về trình tự được xác định ở đây là tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin trong trình tự ứng cử mà đồng nhất với các gốc kháng thể gốc, sau khi sắp xếp

thẳng hàng các trình tự và đưa vào các chỗ thiếu, nếu cần, để đạt được phần trăm đồng nhất trình tự tối đa. Mức tương đồng hoặc đồng nhất trình tự sẽ không bị ảnh hưởng bởi các đoạn kéo dài, các khuyết đoạn, hoặc các xen đoạn đầu tận cùng N, đầu tận cùng C hoặc các đoạn kéo dài, các khuyết đoạn, hoặc các xen đoạn bên trong vào trình tự kháng thể. Phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị vẫn có khả năng gắn kết với CEA liên kết màng người. Theo một phương án, ABM kháng CEA gắn kết với cùng epitop như epitop của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Theo một phương án, ABM kháng CEA cạnh tranh để gắn kết với CEA liên kết màng người với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc và không gắn kết với CEA tan được người. ABM kháng CEA có các đặc tính tốt hơn với các đặc tính của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Ví dụ, thể biến dị có ái lực gắn kết mạnh hơn, độ ổn định cao, và/hoặc khả năng được nâng cao để kích thích độc tính tế bào do kháng thể tạo ra *in vitro* và *in vivo*. Theo một phương án, ABM kháng CEA có độ ổn định cao và vẫn có hoặc có ái lực gắn kết được cải thiện để kích thích độc tính tế bào do kháng thể tạo ra *in vitro* và *in vivo*.

Để phân tích các đặc tính này, thường sẽ phải so sánh phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị và phân tử gắn kết kháng nguyên gốc theo cùng một định dạng; ví dụ, dạng Fab của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị với dạng Fab của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc hoặc dạng có độ dài đầy đủ của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị với dạng có độ dài đầy đủ của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị có hoạt tính sinh học tăng gấp ít nhất khoảng 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, 11 lần, 12 lần, 13 lần, 14 lần, 15 lần, 16 lần, 17 lần, 18 lần, 19 lần, hoặc 20 lần nếu so với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là thể biến dị được biến đổi di truyền ổn định mà có tính ổn định tăng như so với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Độ ổn định có thể được thử nghiệm bằng phương pháp bất kỳ đã biết nào trong lĩnh vực kỹ thuật và bằng các phương pháp được mô tả ở đây, đặc biệt trong các Ví dụ 3-6. Theo các phương

án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị có tính ổn định tăng ít nhất khoảng 1,5 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, 11 lần, 12 lần, 13 lần, 14 lần, 15 lần, 15 lần, 16 lần, 17 lần, 18 lần, 19 lần, 20 lần, 40 lần, 50 lần, 100 lần như so với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị có tính ổn định tăng mà được xác định là sự thay đổi về thông số ổn định như so với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị có sự thay đổi về thông số ổn định ít nhất khoảng 1,5 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, 11 lần, 12 lần, 13 lần, 14 lần, 15 lần, 15 lần, 16 lần, 17 lần, 18 lần, 19 lần, 20 lần, 40 lần, 50 lần, 100 lần như so với thông số ổn định gắn kết kháng nguyên A chẳng hạn, nhiệt độ mà tại đó phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị không gấp cuộn hoặc biến tính, áp suất mà tại đó phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị không gấp cuộn hoặc biến tính, hoặc thời gian cần thiết để làm biến tính hoặc không gấp cuộn phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị trong các điều kiện dự kiến làm cho phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị không ổn định. Theo một phương án, tính ổn định gia tăng được xác định bằng thử nghiệm làm biến tính bằng nhiệt, ví dụ bằng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC). Theo một phương án, tính ổn định gia tăng được xác định bằng thử nghiệm biến tính hoá học. Theo một phương án, tính ổn định gia tăng được xác định nhờ sử dụng thử nghiệm áp suất cao. Theo một phương án khác, tính ổn định của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị được xác định nhờ sử dụng thử nghiệm phân cực huỳnh quang. Theo một phương án, tính ổn định của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị được xác định nhờ sử dụng thử nghiệm tán xạ ánh sáng động (DLS). (Xem các ví dụ và, ví dụ, Nobbmann, U. và các đồng tác giả, *Biotech. Genetic Eng. Rev.* 24:117-128 (2007). DLS kiểm soát tính nguyên vẹn của phân tử, như kháng thể, trong đó, nói chung, độ gia tăng tán xạ ánh sáng biểu thị sự không gấp cuộn hoặc biến tính protein. DLS của các phân tử có thể được kiểm tra nhờ tính năng của nhiệt độ hoặc các chất làm biến tính để so sánh với các tính ổn định tương đối. Các phân tử mà vẫn còn cấu dạng tự nhiên của chúng (tăng một chút hoặc không tăng các đặc tính

DLS) được cho là ổn định trong các điều kiện thử nghiệm. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị ổn định ở nhiệt độ mà cao hơn ABM gốc ít nhất 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, hoặc 10,0 độ C, hoặc phân tử tham khảo thích hợp khác, khi được phân tích nhờ sử dụng thử nghiệm tán xạ ánh sáng động. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị ổn định ở 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 độ C hoặc cao hơn. Tính ổn định nhiệt có thể được xác định, ví dụ, nhờ sử dụng DLS, DSC, hoặc phân cực huỳnh quang. Theo một phương án, tính ổn định nhiệt của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị được xác định nhờ sử dụng DLS. Theo một phương án, thử nghiệm DLS được tiến hành nhờ sử dụng 1mg/ml ABM hoặc ABM biến dị trong dung dịch đệm gồm 20mM Histidin và 140mM NaCl ở độ pH 6,0. Thử nghiệm DLS được tiến hành bắt đầu ở 25°C với sự gia tăng nhiệt độ dần là 0,05°C/phút.

Thuật ngữ phân tử gắn kết kháng nguyên "gốc" đề cập đến ABM được sử dụng làm điểm hoặc gốc bắt đầu để tạo ra thể biến dị. Theo một phương án đặc biệt, phân tử gắn kết kháng nguyên gốc có vùng khung người và, nếu có, có (các) vùng kháng thể ổn định người. Ví dụ, kháng thể gốc có thể là kháng thể người hoặc được làm giống như của người.

"Các thay thế" axit amin có thể tạo ra sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có các đặc tính hóa học và/hoặc cấu trúc tương tự, ví dụ các thay thế axit amin bảo toàn. Các thay thế axit amin "bảo toàn" có thể được tạo ra dựa vào sự tương tự về độ phân cực, điện tích, độ hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước và/hoặc tính lưỡng tính của các gốc liên quan. Ví dụ, các axit amin không phân cực (kỵ nước) bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan, và methionin; các axit amin trung tính phân cực bao gồm glyxin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin; các axit amin tích điện dương (bazơ) bao gồm arginin, lysin, và histidin; và các axit amin tích điện âm (axit) bao gồm axit aspartic và axit glutamic. "Các xen đoạn" hoặc "các khuyết đoạn" thường nằm

trong khoảng từ 1 đến 20 axit amin, cụ thể hơn là khoảng từ 1 đến 10 axit amin, và còn cụ thể hơn nữa là khoảng từ 2 đến 5 axit amin. Các thay thế không bảo toàn sẽ đòi hỏi trao đổi một phần tử của một trong các nhóm đó cho nhóm khác. Ví dụ, các thay thế axit amin cũng có thể tạo ra sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có các đặc tính hóa học và/hoặc cấu trúc khác nhau, ví dụ, thay thế axit amin của một nhóm (ví dụ phân cực) bằng axit amin khác của nhóm khác (ví dụ bazơ). Biến đổi cho phép xác định được theo thử nghiệm bằng cách tạo ra một cách có hệ thống các xen đoạn, khuyết đoạn hoặc thay thế của các axit amin trong phân tử polypeptit nhờ sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và thử nghiệm các thể biến dị tái tổ hợp thu được về hoạt tính.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" đề cập đến mảnh kháng thể bao gồm miền VH và miền VL làm chuỗi polypeptit đơn. Thông thường, các miền VH và miền VL được liên kết bằng trình tự liên kết. Xem, ví dụ Pluckthun, trong: *The PHARMACOLOGY OF ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg và Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "mảnh kháng thể minime" đề cập đến dẫn xuất scFv homodime, hóa trị hai chứa vùng ổn định, thường là vùng CH3 của globulin miễn dịch, tốt hơn là IgG, tốt hơn nữa là IgG1, làm vùng nhị trùng hóa. Nói chung, vùng ổn định được nối với scFv qua vùng bản lề và/hoặc vùng liên kết. Các ví dụ về các protein mảnh kháng thể minime có thể được thấy trong tài liệu Hu và các đồng tác giả (1996), *Cancer Res.* 56: 3055-61.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "mảnh kháng thể dime" đề cập đến các mảnh kháng thể nhỏ với hai điểm gắn kết kháng nguyên, các mảnh đó bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) nối với miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong cùng chuỗi polypeptit (VH -VL). Bằng cách sử dụng một liên kết mà quá ngắn để cho phép ghép đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, các miền được ép để ghép đôi với các miền hỗ trợ của chuỗi kia và tạo ra hai điểm gắn kết kháng nguyên. Các

mảnh kháng thể dime được mô tả đầy đủ hơn, ví dụ trong EP 404,097; công bố đơn quốc tế WO 93/11161; và tài liệu Hollinger và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). Các mảnh kháng thể trime được tạo ra từ sự hình thành trime hóa trị ba của ba scFv, tạo ra ba điểm gắn kết, và các mảnh kháng thể tetrame là tetrame hóa trị bốn của bốn scFv, tạo ra bốn điểm gắn kết.

Đối với trường hợp trong đó có hai hoặc nhiều định nghĩa về thuật ngữ được sử dụng và/hoặc chấp nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này thì định nghĩa về thuật ngữ như được sử dụng ở đây sẽ dự tính bao gồm tất cả các nghĩa này trừ khi được quy định một cách rõ ràng ngược lại. Ví dụ cụ thể là việc sử dụng thuật ngữ "vùng xác định bổ trợ" ("CDR") để mô tả các điểm kết hợp kháng nguyên không liên tục (còn được biết là các vùng gắn kết kháng nguyên) được thấy trong vùng biến đổi của cả polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các CDR cũng được đề cập tới như "các vùng siêu biến" và thuật ngữ đó được sử dụng có thể thay thế cho nhau ở đây với thuật ngữ "CDR" liên quan đến các phần của vùng biến đổi tạo ra các vùng gắn kết kháng nguyên. Vùng đặc biệt này được mô tả bởi Kabat và các đồng tác giả, U.S. Dept. of Health và Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) và bởi Chothia và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, trong đó các định nghĩa bao gồm sự bao trùm hoặc nhóm phụ của các gốc axit amin nếu so sánh với nhau. Tuy nhiên, việc áp dụng hoặc định nghĩa để đề cập đến CDR của kháng thể hoặc các thể biến dị của chúng được dự tính nằm trong phạm vi của thuật ngữ như được xác định và sử dụng ở đây. Các gốc axit amin thích hợp bao gồm các CDR như được xác định bởi từng tài liệu trong các tài liệu trích dẫn ở trên được nêu dưới đây trong Bảng 1 để so sánh. Các số lượng gốc chính xác bao hàm CDR đặc biệt sẽ thay đổi tùy thuộc vào trình tự và kích cỡ của CDR. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thường xác định được các gốc đó bao gồm CDR đặc biệt xác định trình tự axit amin vùng biến đổi của kháng thể.

Bảng 1. Các định nghĩa CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹Đánh số tất cả các định nghĩa CDR trong bảng 1 theo các quy ước đánh số đã nêu của Kabat và các đồng tác giả (xem dưới đây).

²"AbM" với chữ thường "b" như được sử dụng trong bảng 1 đề cập đến các CDR như được xác định bởi phần mềm mô hình hóa kháng thể "AbM" của Oxford Molecular.

Kabat và các đồng tác giả cũng xác định hệ đánh số cho các trình tự miễn biến đổi thích hợp với kháng thể bất kỳ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể ấn định rõ ràng hệ "đánh số Kabat" này cho trình tự miễn biến đổi bất kỳ mà không dựa vào dữ liệu thử nghiệm bất kỳ nào ngoài bản thân trình tự. Như được sử dụng ở đây, "đánh số Kabat" đề cập đến hệ đánh số được đưa ra bởi Kabat và các đồng tác giả, U.S. Dept. of Health và Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi có quy định khác, các tham khảo cách đánh số của các vị trí gốc axit amin đặc hiệu trong ABM theo sáng chế là theo hệ đánh số Kabat. Các trình tự của danh sách trình tự (tức là các SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:216) không được đánh số theo hệ đánh số

Kabat. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ cách để chuyển cách đánh số các trình tự của danh sách trình tự thành cách đánh số Kabat.

Theo như axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất, ví dụ, 95% "đồng nhất" với trình tự nucleotit tham khảo theo sáng chế, dự tính rằng trình tự nucleotit của polynucleotit đồng nhất với trình tự tham khảo ngoại trừ là trình tự polynucleotit có thể bao gồm tới năm đột biến điểm trên mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit tham khảo. Nói cách khác, để thu được polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất đồng nhất 95% với trình tự nucleotit tham khảo, tới 5% các nucleotit trong trình tự tham khảo có thể bị làm khuyết đoạn, hoặc thay thế bằng nucleotit khác, hoặc số lượng các nucleotit lên tới 5% của toàn bộ nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được xen đoạn vào trình tự tham khảo.

Trên thực tế, hoặc phân tử axit nucleic hoặc polypeptit đặc biệt bất kỳ đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự nucleotit hoặc trình tự polypeptit theo sáng chế có thể được xác định theo cách thông thường nhờ các chương trình máy tính đã biết. Phương pháp để xác định đối tượng toàn diện nhất giữa trình tự xem xét (trình tự theo sáng chế) và trình tự đối tượng, cũng được đề cập tới như sự sắp xếp thẳng hàng trình tự chung, có thể được xác định nhờ sử dụng chương trình máy tính FASTDB dựa vào thuật toán của Brutlag và các đồng tác giả, *Comp. Appl. Biosci.* 6:237-245 (1990). Theo cách sắp xếp thẳng hàng trình tự các trình tự xem xét và đối tượng hoặc là cả hai trình tự ADN. Trình tự ARN có thể được so sánh bằng cách biến đổi U's thành T's. Kết quả của việc sắp xếp thẳng hàng trình tự chung này là phần trăm đồng nhất. Các thông số ưu tiên được sử dụng để sắp xếp thẳng hàng bằng chương trình FASTDB các trình tự ADN để tính toán phần trăm đồng nhất là: Matrix= đơn nhất, bộ dữ liệu k=4, điểm bổ sung không khớp=1, điểm bổ sung kết hợp=20, Độ dài nhóm ngẫu nhiên =0, điểm cắt=1, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0,05, Window Size=500 hoặc độ dài của trình tự nucleotit đối tượng, bất kỳ loại nào ngắn hơn.

Nếu trình tự đối tượng ngắn hơn trình tự xem xét do các khuyết đoạn 5' hoặc 3', không phải do các khuyết đoạn bên trong, thì việc hiệu chỉnh thủ công phải được thực hiện đối với các kết quả. Điều này là do chương trình FASTDB không tính đến các đoạn làm cùn đầu 5' và 3' của trình tự đối tượng khi tính toán phần trăm đồng nhất. Đối với các trình tự đối tượng đã làm cùn đầu tại các đầu tận cùng 5' hoặc 3', so với trình tự xem xét, phần trăm đồng nhất được hiệu chỉnh bằng cách tính toán số lượng các gốc bazơ của trình tự xem xét mà là 5' và 3' của trình tự đối tượng, chúng không được ghép đôi/sắp thẳng hàng, là phần trăm của toàn bộ bazơ của trình tự xem xét. Liệu nucleotit được ghép đôi/sắp thẳng hàng được xác định bằng các kết quả của việc sắp thẳng hàng trình tự bằng chương trình FASTDB hay không. Sau đó lấy phần trăm đồng nhất trừ đi tỷ lệ phần trăm này, được tính toán bằng chương trình FASTDB nêu trên nhờ sử dụng các tham số quy định, để đạt được tỷ số phần trăm đồng nhất cuối cùng. Tỷ số đã hiệu chỉnh này là tỷ số được sử dụng cho các mục đích theo sáng chế. Chỉ các bazơ ngoài các bazơ 5' và 3' của trình tự đối tượng, như được thể hiện bởi việc sắp thẳng hàng trình tự bằng chương trình FASTDB, mà không được ghép đôi/sắp thẳng hàng với trình tự xem xét, được tính toán nhằm các mục đích điều chỉnh thủ công tỷ số phần trăm đồng nhất.

Ví dụ, trình tự đối tượng có 90 gốc bazơ được sắp thẳng hàng với trình tự xem xét có 100 gốc bazơ để xác định phần trăm đồng nhất. Khuyết đoạn xuất hiện ở đầu tận cùng 5' của trình tự đối tượng và vì vậy việc sắp thẳng hàng bằng chương trình FASTDB không thể hiện sự ghép đôi/xếp thẳng hàng của 10 bazơ thứ nhất tại đầu tận cùng 5'. 10 bazơ không ghép đôi thể hiện 10% trình tự (số lượng các bazơ tại các đầu tận cùng 5' và 3' không ghép đôi/tổng số các bazơ trong trình tự xem xét) như vậy định mức phần trăm đồng nhất đã tính toán bằng chương trình FASTDB bị trừ đi 10%. Nếu 90 bazơ còn lại được ghép đôi hoàn toàn thì phần trăm đồng nhất cuối cùng sẽ là 90%. Trong một ví dụ khác, trình tự đối tượng có 90 gốc bazơ được so sánh với trình tự xem xét có 100 bazơ. Lần này các khuyết đoạn là các khuyết đoạn bên trong cho nên không có các bazơ trên các đầu tận cùng 5' và

3' của trình tự đối tượng mà không được ghép đôi/xếp thẳng hàng với trình tự xem xét. Đối với trường hợp này, phần trăm đồng nhất tính toán bằng chương trình FASTDB không được hiệu chỉnh thủ công. Một lần nữa, chỉ các bazơ trên các đầu tận cùng 5' và 3' của trình tự đối tượng mà không được ghép đôi/xếp thẳng hàng với trình tự xem xét được hiệu chỉnh thủ công. Không có các hiệu chỉnh thủ công nào khác được thực hiện cho các mục đích của sáng chế.

Theo như polypeptit có trình tự axit amin ít nhất, ví dụ, 95% "đồng nhất" với trình tự axit amin xem xét theo sáng chế, dự tính rằng trình tự axit amin của polypeptit đối tượng đồng nhất với trình tự xem xét ngoại trừ là trình tự polypeptit đối tượng có thể bao gồm tới năm biến đổi axit amin trên mỗi 100 axit amin của trình tự axit amin xem xét. Nói cách khác, để thu được polypeptit có trình tự axit amin ít nhất 95% đồng nhất với trình tự axit amin xem xét, tới 5% các gốc axit amin ở trình tự đối tượng có thể xen đoạn, làm khuyết đoạn, hoặc được thay thế bằng axit amin khác. Các biến đổi đó của trình tự tham khảo có thể xuất hiện tại các vị trí tận cùng amino hoặc carboxy của trình tự axit amin tham khảo hoặc bất kỳ nơi nào giữa các vị trí tận cùng đó, đặt rải rác hoặc riêng rẽ giữa các gốc trong trình tự tham khảo hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề trong trình tự tham khảo.

Trên thực tế, hoặc polypeptit đặc biệt bất kỳ đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự polypeptit tham khảo có thể được xác định theo cách thông thường nhờ các chương trình máy tính đã biết. Phương pháp để xác định đối tượng toàn diện nhất giữa trình tự xem xét (trình tự theo sáng chế) và trình tự đối tượng, cũng được đề cập tới như sự sắp xếp thẳng hàng trình tự chung, có thể được xác định nhờ sử dụng chương trình máy tính FASTDB dựa vào thuật toán của Brutlag và các đồng tác giả, *Comp. Appl. Biosci.* 6:237-245 (1990). Theo cách sắp xếp thẳng hàng trình tự, các trình tự xem xét và đối tượng hoặc là cả hai trình tự nucleotit hoặc là cả hai trình tự axit amin. Kết quả của việc sắp xếp thẳng hàng trình tự chung này là theo phần trăm đồng nhất. Các thông số ưu tiên được sử dụng để sắp xếp thẳng hàng axit amin bằng chương trình

FASTDB là: Matrix= PAM 0, bộ dữ liệu k=2, điểm bổ sung không khớp=1, điểm bổ sung kết hợp=20, Độ dài nhóm ngẫu nhiên =0, điểm cắt=1, Window Size = độ dài trình tự, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty= 0,05, Window Size=500 hoặc độ dài của trình tự axit amin đối tượng, bất kỳ loại nào ngắn hơn.

Nếu trình tự đối tượng ngắn hơn trình tự xem xét do các khuyết đoạn đầu tận cùng N- hoặc C-, mà không phải do các khuyết đoạn bên trong, thì việc hiệu chỉnh thủ công phải được thực hiện đối với các kết quả. Điều này là do chương trình FASTDB không tính đến các đoạn làm cùn đầu tại đầu tận cùng N- và C- của trình tự đối tượng khi tính toán phần trăm đồng nhất chung. Đối với các trình tự đối tượng đã làm cùn đầu đầu tận cùng N- và C, so với trình tự xem xét, phần trăm đồng nhất được hiệu chỉnh bằng cách tính toán số lượng các gốc của trình tự xem xét mà là đầu tận cùng N- và C của trình tự đối tượng, chúng không được ghép đôi/sắp thẳng hàng với gốc đối tượng tương ứng, là phần trăm của toàn bộ các bazơ của trình tự xem xét. Liệu gốc được ghép đôi/sắp thẳng hàng được xác định bằng các kết quả của việc sắp thẳng hàng trình tự bằng chương trình FASTDB hay không. Sau đó lấy phần trăm đồng nhất trừ đi tỷ lệ phần trăm này, đã tính toán bằng chương trình FASTDB nêu trên nhờ sử dụng các tham số quy định, để thu được tỷ số phần trăm đồng nhất cuối cùng. Tỷ số phần trăm đồng nhất cuối cùng này là tỷ số được sử dụng cho các mục đích theo sáng chế. Chỉ các gốc thuộc đầu tận cùng N- và C của trình tự đối tượng mà không được ghép đôi/sắp thẳng hàng với trình tự xem xét, được coi là các mục đích của việc điều chỉnh thủ công tỷ số phần trăm đồng nhất. Tức là, chỉ các vị trí gốc xem xét bên ngoài các gốc đầu tận cùng N- và C xa nhất của trình tự đối tượng.

Ví dụ, trình tự đối tượng có 90 gốc axit amin được sắp thẳng hàng với trình tự xem xét có 100 gốc để xác định phần trăm đồng nhất. Khuyết đoạn xuất hiện ở đầu tận cùng N của trình tự đối tượng và vì vậy việc sắp thẳng hàng bằng chương trình FASTDB không thể hiện sự ghép đôi/xếp thẳng hàng của 10 gốc thứ nhất tại đầu tận cùng N. 10 gốc không ghép đôi thể hiện 10% trình tự (số lượng các gốc tại

đầu tận cùng N- và C- không ghép đôi/tổng số các gốc ở trình tự xem xét) như vậy định mức phần trăm đồng nhất đã tính toán bằng chương trình FASTDB bị trừ đi 10%. Nếu 90 gốc còn lại được ghép đôi hoàn toàn thì phần trăm đồng nhất cuối cùng là 90%. Trong một ví dụ khác, trình tự đối tượng có 90 gốc được so với trình tự xem xét có 100 gốc. Lần này các khuyết đoạn là các khuyết đoạn bên trong cho nên không có các gốc tại đầu tận cùng N- và C- của trình tự đối tượng mà không được ghép đôi/xếp thẳng hàng với trình tự xem xét. Đối với trường hợp này, phần trăm đồng nhất tính toán bằng chương trình FASTDB không được hiệu chỉnh thủ công. Một lần nữa, chỉ các vị trí gốc bên ngoài các đầu tận cùng N- và C- của trình tự đối tượng, như thể hiện bằng cách xếp thẳng hàng bằng chương trình FASTDB, mà không được ghép đôi/xếp thẳng hàng với trình tự xem xét để được hiệu chỉnh thủ công. Không có các hiệu chỉnh thủ công nào khác được thực hiện cho các mục đích của sáng chế.

Phần trăm đồng nhất của các polynucleotit và/hoặc các polypeptit cũng có thể được xác định nhờ sử dụng chương trình BLAST có thể mua được từ National Center for Biotechnology Information (NCBI), với các thông số mặc định biểu thị các chương trình.

Như được sử dụng ở đây, axit nucleic "lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt" thành trình tự axit nucleic theo sáng chế, đề cập đến polynucleotit lai hóa trong các điều kiện chỉ định, ví dụ bằng quá trình ủ qua đêm ở 42°C trong dung dịch bao gồm 50% formamit, 5x SSC (750mM NaCl, 75mM natri xitrat), 50mM natri phosphat (độ pH 7,6), 5x dung dịch Denhardt, 10% dextran sulfat, và 20µg/ml ADN tinh trùng cá hồi bị cắt, làm biến tính, tiếp theo là rửa các bộ lọc trong 0,1x SSC ở khoảng 65°C.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polypeptit có hoạt tính GnTIII" đề cập đến các polypeptit mà có thể xúc tác quá trình bổ sung gốc N-axetylglucosamin (GlcNAc) trong liên kết β -1-4 vào mannosit liên kết α của trimannosyl nhân của

các oligosacarit liên kết N. Chúng bao gồm các polypeptit dung hợp có hoạt tính enzym tương tự với, nhưng không cần thiết đồng nhất với, hoạt tính của $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III, còn được biết là α -1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyl-transferaza (EC 2.4.1.144), theo tài liệu Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), như được xác định trong thử nghiệm sinh học đặc biệt, có hoặc không có tính phụ thuộc liều. Đối với trường hợp trong đó tính phụ thuộc liều tồn tại, không cần phải đồng nhất với hoạt tính của GnTIII, nhưng đúng hơn là về căn bản tương tự với tính phụ thuộc liều trong hoạt tính đã cho so với GnTIII (tức là polypeptit ứng cử sẽ có hoạt tính lớn hơn hoặc hoạt tính lớn hơn nhưng dưới 25 lần và tốt hơn nếu hoạt tính lớn hơn dưới mười lần, và tốt nhất là lớn hơn nhưng dưới 3 lần so với GnTIII.).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền định vị Golgi" đề cập đến trình tự axit amin của polypeptit định vị tại Golgi mà tạo ra sự neo polypeptit vào vị trí trong phức hệ Golgi. Nói chung, các miền định vị bao gồm "các đuôi" tận cùng amino của enzym.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chức năng tác động" đề cập đến các hoạt tính sinh học của vùng Fc (vùng trình tự Fc nguyên thể hoặc vùng trình tự axit amin Fc biến đổi) của kháng thể. Các ví dụ về các chức năng tác động kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ái lực gắn kết thụ thể Fc, độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), tiết xuất xytokin, hấp thụ kháng nguyên do phức hệ miễn dịch tạo ra nhờ các tế bào thể hiện kháng nguyên, điều chỉnh giảm các thụ thể bề mặt tế bào, v.v..

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "biến đổi di truyền, được biến đổi di truyền, kỹ thuật biến đổi di truyền" đặc biệt là với tiếp đầu ngữ "glyco-," cũng như thuật ngữ "kỹ thuật biến đổi di truyền bằng glycosyl hóa" được cho là bao gồm thao tác bất kỳ của dạng glycosyl hóa của polypeptit tái tổ hợp hoặc xuất hiện tự nhiên

hoặc mảnh của chúng. Kỹ thuật biến đổi di truyền bằng glycosyl hóa bao gồm kỹ thuật biến đổi di truyền chuyển hóa cơ cấu glycosyl hóa của tế bào, kể cả các thao tác di truyền của các quá trình tổng hợp oligosacarit để đạt được sự glycosyl hóa biến đổi của các glycoprotein biểu hiện trong các tế bào. Ngoài ra, kỹ thuật biến đổi di truyền bằng glycosyl hóa bao gồm các tác động của các đột biến và môi trường tế bào đối với quá trình glycosyl hóa. Theo một phương án, kỹ thuật biến đổi di truyền bằng glycosyl hóa là sự biến đổi về hoạt tính glycosyltransferaza. Theo một phương án đặc biệt, kỹ thuật biến đổi di truyền tạo ra hoạt tính glucosaminyltransferaza và/hoặc hoạt tính fucosyltransferaza biến đổi.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào chủ" đề cập đến bất kỳ loại nào của hệ tế bào mà có thể được biến đổi di truyền để tạo ra các polypeptit và các phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào chủ được biến đổi di truyền để cho phép tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên với các glycoform cải biến. Theo một phương án ưu tiên, phân tử gắn kết kháng nguyên là kháng thể, mảnh kháng thể, hoặc protein dung hợp. Theo một số phương án, các tế bào chủ còn được thao tác thêm để biểu hiện các mức cao của một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính GnTIII. Các tế bào chủ bao gồm các tế bào đã nuôi cấy, ví dụ các tế bào động vật có vú đã nuôi cấy, như các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NS0, các tế bào Sp2/0, các tế bào u tủy YO, các tế bào u tủy chuột P3X63, các tế bào PER, các tế bào PER.C6 hoặc các tế bào lai, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, và các tế bào thực vật, chỉ mới gọi tên một số, ngoài ra còn bao gồm các tế bào ở động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc thực vật cấy ghép hoặc mô động vật.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "độc tính tế bào do Fc tạo ra" bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và độc tính tế bào do protein dung hợp Fc tan được chứa vùng Fc người tạo ra. Nó là cơ chế miễn dịch dẫn đến sự phân giải của "các tế bào đích" bằng "các tế bào hiệu ứng miễn dịch người."

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "các tế bào hiệu ứng miễn dịch người" đề cập đến tập hợp các bạch cầu thể hiện các thụ thể Fc trên bề mặt của chúng, nhờ nó chúng gắn kết với vùng Fc của các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc của các protein dung hợp Fc và thực hiện các chức năng tác động. Tập hợp này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và/hoặc các tế bào giết tự nhiên (NK).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "các tế bào đích" đề cập đến các tế bào mà các phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng Fc (ví dụ các kháng thể hoặc các mảnh của chúng bao gồm vùng Fc) hoặc các protein dung hợp Fc gắn kết đặc hiệu với. Các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các protein dung hợp Fc gắn kết với các tế bào đích qua phần protein tức là đầu tận cùng N với vùng Fc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "độc tính tế bào do Fc tạo ra cao" được xác định là hoặc sự gia tăng về số lượng "các tế bào đích" mà được làm tan trong thời gian đã cho, với nồng độ đã cho của phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc protein dung hợp Fc trong môi trường bao quanh các tế bào đích, bằng cơ chế độc tính tế bào do Fc tạo ra được xác định ở trên, và/hoặc sự giảm nồng độ của phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc protein dung hợp Fc trong môi trường bao quanh các tế bào đích, cần đến để đạt được sự phân giải số lượng đã cho của "các tế bào đích", trong thời gian đã cho, bằng cơ chế gây độc tế bào do Fc tạo ra. Sự gia tăng độc tính tế bào do Fc tạo ra tỷ lệ với độc tính tế bào được tạo ra bởi cùng phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc protein dung hợp Fc được tạo ra bởi cùng loại tế bào chủ, nhờ sử dụng cùng các phương pháp tạo ra, tinh chế, bào chế và lưu giữ chuẩn (các phương pháp đó là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này) nhưng nó không được tạo ra bằng các tế bào chủ đã biến đổi di truyền để có dạng glycosyl hóa biến đổi (ví dụ để biểu hiện glycosyltransferaza, GnTIII, hoặc các glycosyltransferaza khác) bằng các phương pháp được mô tả ở đây.

Bằng "phân tử gắn kết kháng nguyên có độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC)" có nghĩa là phân tử gắn kết kháng nguyên, khi thuật ngữ đó được xác định ở đây, có ADCC tăng như được xác định bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Được chấp nhận trong thử nghiệm ADCC in vitro là như sau:

1) thử nghiệm sử dụng các tế bào đích mà đã biết để biểu hiện kháng nguyên đích được nhận dạng bởi vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể;

2) thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (PBMCs), được phân lập từ máu của người cho khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên, làm các tế bào hiệu ứng;

3) thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp dưới đây:

i) các PBMC được phân lập nhờ sử dụng các quy trình làm ly tâm tỷ trọng chuẩn và được tạo huyền phù với 5×10^6 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào RPMI;

ii) các tế bào đích được nuôi cấy bằng các phương pháp nuôi cấy mô chuẩn, thu hoạch từ pha sinh trưởng theo hàm số mũ với khả năng sống được cao hơn 90%, rửa trong môi trường nuôi cấy tế bào RPMI, đánh dấu bằng 100 micro-Curi ^{51}Cr , rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy tế bào, và tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy tế bào với mật độ 105 tế bào/ml;

iii) 100 microlit huyền phù tế bào đích cuối cùng nêu trên được chuyển vào mỗi giếng của đĩa vi chuẩn độ 96 giếng;

iv) kháng thể được pha loãng theo bậc từ 4000 ng/ml thành 0,04 ng/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào và 50 microlit dung dịch kháng thể thu được được thêm vào các tế bào đích trong đĩa vi chuẩn độ 96 giếng, thử nghiệm bằng ba nồng độ kháng thể khác nhau bao hàm toàn bộ giới hạn nồng độ nêu trên;

v) đối với các đối chứng giải phóng tối đa (MR), 3 giếng khác trong đĩa chứa các tế bào đích đã đánh dấu, nhận 50 microlit dung dịch nước 2% (thể tích/thể tích) chứa chất tẩy rửa không ion (Nonidet, Sigma, St. Louis), thay cho dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vi) đối với các đối chứng giải phóng tự phát (SR), 3 giếng khác trong đĩa chứa các tế bào đích đã đánh dấu, nhận 50 microlit môi trường nuôi cấy tế bào RPMI thay cho dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vii) đĩa vi chuẩn độ 96 giếng sau đó được làm ly tâm với 50 x g trong 1 phút và ủ trong 1 giờ ở 4°C;

viii) 50 microlit huyền phù PBMC (điểm i nêu trên) được thêm vào mỗi giếng để thu được tỷ lệ tế bào hiệu ứng:đích là 25:1 và các đĩa được đặt trong lồng ấp dưới khí CO₂ 5% ở 37°C trong 4 giờ;

ix) dịch nổi không chứa tế bào từ mỗi giếng được thu hoạch và độ phóng xạ giải phóng qua thử nghiệm (ER) được xác định số lượng nhờ sử dụng ống đếm gama;

x) tỷ lệ phần trăm của phân giải đặc hiệu được tính toán đối với từng nồng độ kháng thể theo công thức $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, trong đó ER là độ phóng xạ trung bình đã được xác định số lượng (xem điểm ix nêu trên) cho nồng độ kháng thể đó, MR là độ phóng xạ trung bình đã được xác định số lượng (xem điểm ix nêu trên) cho các đối chứng MR (xem điểm v nêu trên), và SR là độ phóng xạ trung bình đã được xác định số lượng (xem điểm ix nêu trên) cho các đối chứng SR (xem điểm vi nêu trên);

4) "ADCC tăng" được xác định là hoặc tăng về tỷ lệ phần trăm tối đa của sự phân giải đặc hiệu được thấy trong giới hạn nồng độ kháng thể được thử nghiệm ở trên, và/hoặc sự giảm về nồng độ của kháng thể cần thiết để đạt được một nửa tỷ lệ phần trăm tối đa của sự phân giải đặc hiệu được thấy trong giới hạn nồng độ kháng

thể được thử nghiệm ở trên. Sự gia tăng ADCC tỷ lệ với ADCC, được xác định bằng thử nghiệm nêu trên, được tạo ra bởi cùng kháng thể, tạo ra bởi cùng loại tế bào chủ, nhờ sử dụng cùng các phương pháp tạo ra, tinh chế, bào chế và lưu giữ chuẩn, các phương pháp đó là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, nhưng nó không được tạo ra bằng các tế bào chủ đã biến đổi di truyền để biểu hiện quá mức GnTIII.

Các phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA, các Polypeptit, và các Polynucleotit

CEA đã được sử dụng từ lâu làm chỉ số bệnh ung thư cho các mục đích chẩn đoán. Nó được biểu hiện bất thường (ví dụ biểu hiện quá mức và/hoặc phân bố dưới dạng khác nhau trong tế bào) trong nhiều mô khối u so với các mô không phải u của cùng loại tế bào. Tuy nhiên, do CEA thường tách khỏi bề mặt tế bào u và phần lớn các kháng thể kháng CEA có hiệu lực cũng gắn kết với CEA tan được, các kháng thể không tiếp hợp với CEA thường không được sử dụng cho các mục đích chữa bệnh. Ví dụ, các kháng thể kháng CEA mà đang sử dụng trong các thử nghiệm thí điểm được cung cấp làm các thể tiếp hợp phóng xạ (Wong và các đồng tác giả., 2004; Liersch và các đồng tác giả., 2007). Một vài cơ chế liên quan đến hiệu quả chữa bệnh của các kháng thể kháng CEA, bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Biểu hiện CEA tăng thúc đẩy sự dính bám gian bào tăng mà nó là nguyên nhân gây ra sự di căn của các tế bào ung thư (Marshall J., *Semin Oncol.* 30(3) Suppl. 8:30-36). Vì vậy, các phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA cũng có thể đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế sự dính bám tế bào và sự di căn của các tế bào ung thư do CEA gây ra.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên (ví dụ kháng thể hoặc mảnh của chúng) bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) CDR của kháng thể chuột PR1A3, trong đó ít nhất một trong các CDR có thay thế ít nhất một gốc axit amin so với CDR tương ứng của PR1A3, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên có ái lực cao đối với CEA, tốt hơn là

CEA liên kết màng so với phân tử gắn kết kháng nguyên PR1A3 gốc. Công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế WO2011023787 mô tả các phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA có ái lực cao đối với CEA như so với phân tử gắn kết kháng nguyên PR1A3 gốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) CDR của kháng thể chuột PR1A3, trong đó ít nhất một trong các CDR có thay thế ít nhất một gốc axit amin so với CDR tương ứng của PR1A3, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên có độ ổn định tăng so với phân tử gắn kết kháng nguyên PR1A3 gốc. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên PR1A3 gốc là phân tử gắn kết kháng nguyên PR1A3 được làm giống như của người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên PR1A3 gốc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng CH7A (SEQ ID NO:101). Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên PR1A3 gốc bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng CH7A (SEQ ID NO:101) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2F1 (SEQ ID NO: 209). Một hoặc nhiều CDR như vậy có là các CDR được làm cùn đầu và sẽ chứa, ít nhất, các gốc xác định tính đặc hiệu (SDRs), khi thuật ngữ đó được xác định ở đây, đối với CDR đã cho. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm ít nhất một (ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) CDR được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 và 217-224 (Fig.32 và Fig.36), bao gồm các gốc của các CDR mà sẽ vẫn có gắn kết đặc hiệu. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm ít nhất một (ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) CDR được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 và 217-224, hoặc dạng biến dị hoặc làm cùn đầu của chúng chứa ít nhất các gốc xác định tính đặc hiệu đối với CDR nêu trên, và bao gồm trình tự thu được từ polypeptit khác dạng. Theo một phương án cụ thể, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm thể biến dị chuỗi nặng CDR1 của PR1A3, HCDR1 có glutamat thay thế cho valin tại vị trí Kabat 31. Theo một phương án cụ thể, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm thể biến dị chuỗi nặng CDR3 của PR1A3, HCDR3 có alanin thay thế cho tyrosin tại vị trí Kabat 98 hoặc tyrosin thay

thể cho aspartat tại vị trí Kabat 99. Theo một phương án cụ thể, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm thể biến dị chuỗi nặng CDR3 của PR1A3, HCDR3 có alanin thay thế cho tyrosin tại vị trí Kabat 98 và tyrosin thay thế cho aspartat tại vị trí Kabat 99.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm một chuỗi nặng CDR3 được chọn từ các SEQ ID NO: 217-224 (Fig.36) và hai chuỗi nặng CDR (ví dụ HCDR1 và HCDR2) được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, và 12-24 và/hoặc ba chuỗi nhẹ CDR (ví dụ. LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chọn từ các SEQ ID NO: 36-56, hoặc các thể biến dị hoặc các dạng được làm cùn đầu của chúng chứa ít nhất các gốc xác định tính đặc hiệu cho mỗi trong các CDR. Theo một phương án cụ thể hơn, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm một chuỗi nặng CDR3 được chọn từ các SEQ ID NO: 217-224 và hai chuỗi nặng CDR (ví dụ HCDR1 và HCDR2) được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, và 12-24 và ba chuỗi nhẹ CDR (ví dụ LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chọn từ các SEQ ID NO: 36-56. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ kháng thể, tốt hơn là cả vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Theo một phương án đặc biệt hơn, vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được chọn từ vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được chọn từ các SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NOs: 188-216, và các SEQ ID NO: 225-248 (Fig.33 và Fig.37A-C) hoặc tổ hợp của chúng, trong đó, vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ không là tổ hợp của SEQ ID NO:99 và SEQ ID NO:103 hoặc SEQ ID NO:100 và SEQ ID NO:104. Theo một số phương án, chuỗi nặng bao gồm các gốc vùng khung của CH1A1A (SEQ ID NO: 261) hoặc CH1A1B (SEQ ID NO: 262) (Fig. 37C). Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, hoặc SEQ ID NO: 247.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là kháng thể thể khảm, cụ thể hơn nữa là, kháng thể được làm giống như của người. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm vùng Fc. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị có ái lực phát triển trọn vẹn. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị được biến đổi di truyền để có độ ổn định tăng (độ ổn định hoàn thiện). Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị có hoạt tính ADCC tăng so với PR1A3. Theo một phương án, ADCC tăng của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là do sự gia tăng ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị đối với CEA liên kết màng, ví dụ bằng cách sự hoàn thiện ái lực hoặc các phương pháp khác để cải thiện ái lực (xem tài liệu Tang và các đồng tác giả, J. Immunol. 2007, 179:2815-2823, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị bao gồm vùng Fc được biến đổi di truyền bằng glycogen. Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp để tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị như vậy và việc sử dụng chúng để điều trị bệnh, đặc biệt là các rối loạn tăng sinh tế bào trong đó CEA được biểu hiện, đặc biệt trong đó CEA được biểu hiện bất thường (ví dụ biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới dạng biệt hoá trong tế bào) so với mô bình thường của cùng loại tế bào. Các rối loạn như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở bệnh ung thư ruột kết, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy và bệnh ung thư vú. Các mức biểu hiện CEA có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng được mô tả ở đây (ví dụ bằng thử nghiệm miễn dịch hoá học mô, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch enzym, ELISA, đếm dòng tế bào, thử nghiệm chất miễn dịch phóng xạ, phép thấm tách Tây, gắn kết phối tử, hoạt tính kinaza, v.v.).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mà nó mã hóa polypeptit bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) vùng xác định hỗ trợ của kháng thể chuột PR1A3, hoặc các thể biến dị hoặc các dạng được làm cùn đầu của chúng chứa ít nhất các gốc xác

định tính đặc hiệu đối với các vùng xác định hỗ trợ nêu trên. Thông thường, các polynucleotit đã phân lập này mã hóa một hoặc nhiều polypeptit dung hợp mà tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên. Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa một hoặc nhiều (ví dụ một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu) CDR được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 và 217-224, bao gồm các gốc của các CDR mà vẫn có gắn kết đặc hiệu. Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự mà nó mã hóa ít nhất ba chuỗi nặng CDR (ví dụ HCDR1, HCDR2, và HCDR3) và/hoặc ba chuỗi nhẹ CDR (ví dụ LCDR1, LCDR2, và LCDR3 được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 và 217-224, hoặc các thể biến dị hoặc các dạng làm cùn đầu của chúng chứa ít nhất các gốc xác định tính đặc hiệu (SDRs) đối với mỗi trong ba vùng xác định hỗ trợ nêu trên. Theo một phương án cụ thể hơn, polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm một chuỗi nặng CDR3 được chọn từ các SEQ ID NO: 217-224 và hai chuỗi nặng CDR (ví dụ HCDR1 và HCDR2) được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, và 12-24 và ba chuỗi nhẹ CDR (ví dụ LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chọn từ các SEQ ID NO: 36-56. Theo một phương án khác, polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ kháng thể. Các polynucleotit mã hóa các polypeptit vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được biểu hiện trong một hoặc nhiều vật truyền biểu hiện. Theo một phương án đặc biệt hơn, polynucleotit mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được chọn từ các SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NOs: 188-216, và các SEQ ID NO: 225-248 được chọn từ nhóm gồm có các polynucleotit của các SEQ ID NO: 159-187 và các SEQ ID NO: 249-256 hoặc tổ hợp của chúng, trong đó, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ không được mã hóa bởi tổ hợp của SEQ ID NO:11 và SEQ ID NO:115 hoặc SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:116. Theo một phương án, các polypeptit vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bởi các polynucleotit tổ hợp để tạo ra kháng thể thể khảm, đặc biệt hơn là kháng thể được làm giống như của người. Theo một phương án đặc biệt, nếu polynucleotit bao gồm trình tự mà nó mã hóa chuỗi nặng CDR1 của PR1A3 hoặc thể biến dị của chúng, thì polynucleotit này mã hóa glutamat thay

thể cho valin tại vị trí Kabat 31. Theo một phương án cụ thể, nếu polynucleotit bao gồm trình tự mà nó mã hóa chuỗi nặng CDR3 của PR1A3 hoặc thể biến dị của chúng, thì polynucleotit này mã hóa alanin thay thế cho tyrosin tại vị trí Kabat 98 hoặc tyrosin thay thế cho aspartat tại vị trí Kabat 99. Theo một phương án cụ thể, nếu polynucleotit bao gồm trình tự mà nó mã hóa chuỗi nặng CDR3 của PR1A3 hoặc thể biến dị của chúng, thì polynucleotit này mã hóa alanin thay thế cho tyrosin tại vị trí Kabat 98 và tyrosin thay thế cho aspartat tại vị trí Kabat 99. Theo một phương án, polynucleotit mã hóa alanin thay thế cho tyrosin tại vị trí Kabat 98 hoặc tyrosin thay thế cho aspartat tại vị trí Kabat 99 ở khung của CH1A1A (SEQ ID NO: 261) hoặc CH1A1B (SEQ ID NO: 262). Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự mà nó mã hóa chuỗi nặng của SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, hoặc SEQ ID NO: 247. Theo một phương án khác, polynucleotit bao gồm trình tự mà nó mã hóa vùng Fc. Sáng chế còn đề cập đến các polypeptit được mã hóa bởi các polynucleotit này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị (ví dụ kháng thể hoặc mảnh của chúng) và các polypeptit có cùng tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể PR1A3 chuột (ví dụ gắn kết với cùng epitop của CEA liên kết màng), và có các hoạt tính sinh học có thể so sánh hoặc được cải thiện (ví dụ ái lực được cải thiện đối với CEA liên kết màng, độ ổn định tăng, và/hoặc ADCC được tăng cường). Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị gắn kết với cùng epitop như epitop của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị cạnh tranh để gắn kết với CEA người liên kết màng với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị gắn kết với CEA người liên kết màng và không gắn kết với CEA người hoà tan được. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên và phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị và các polypeptit có độ ổn định tăng như so với kháng thể PR1A3 chuột, thể biến dị được làm giống như của người của chúng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên và các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị (ví dụ kháng thể hoặc mảnh của chúng) và các polypeptit mà gắn kết với CEA liên kết màng và có độ ổn định tăng như so với kháng thể PR1A3 được làm giống như của người mà nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của CH7A (SEQ ID NO:101). Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên và các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị (ví dụ kháng thể hoặc mảnh của chúng) và các polypeptit mà nó gắn kết với CEA liên kết màng và có độ ổn định tăng như so với kháng thể PR1A3 được làm giống như của người mà nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng CH7A (SEQ ID NO:101) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2F1 (SEQ ID NO: 209)

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit bao gồm ít nhất một (ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) CDR được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 và 217-224 (Fig.32 và Fig.36). Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit bao gồm: (a) trình tự chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm gồm có: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, và SEQ ID NO:12; (b) trình tự chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm gồm có: SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, và SEQ ID NO:24; và (c) trình tự chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm gồm có: SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, và SEQ ID NO:224. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit bao gồm: (a) trình tự chuỗi nhẹ CDR1 được chọn từ nhóm gồm có: SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, và SEQ ID NO:45; (b) trình tự chuỗi nhẹ CDR được chọn từ nhóm gồm có: SEQ ID NO:46, và SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, và SEQ ID NO:55; và (c) chuỗi

nhẹ CDR3 của SEQ ID NO:56. Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit bao gồm các CDR cũng có các gốc vùng khung CH1A1A (SEQ ID NO: 261) hoặc CH1A1B (SEQ ID NO: 262).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit mà nó gắn kết với CEA liên kết màng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo một phương án, chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được chọn từ các SEQ ID NO: 99-108, các SEQ ID NO: 188-216, và các SEQ ID NO: 225-248 (Fig.33 và Fig.37A-C). Theo một phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm polypeptit có trình tự thuộc trình tự bất kỳ nào của các SEQ ID NO: 225-248. Theo một phương án cụ thể khác, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm polypeptit có trình tự mà đồng nhất ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự thuộc trình tự bất kỳ nào của các SEQ ID NO: 225-248.

Theo một phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm polypeptit có trình tự của SEQ ID NO: 233; SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, và SEQ ID NO: 247. Theo một phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm polypeptit có độ đồng nhất ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, và SEQ ID NO: 247. Theo một phương án, vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm polypeptit có trình tự của SEQ ID NO: 209. Theo một phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm polypeptit có độ đồng nhất ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 209.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị, hoặc polypeptit mà nó gắn kết với CEA liên kết màng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Theo một phương án cụ thể,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm polypeptit có trình tự của SEQ ID NO:4 như dưới đây:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEX¹X²MX³WVRQAPGQG
LEWMGX⁴INTKX⁵GEAX⁶YX⁷EEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAV
YYCARWDX⁸X⁹X¹⁰YX¹¹X¹²X¹³X¹⁴DYWGQGTTVTVSS

trong đó X¹ là Y hoặc F; X² là S hoặc G; X³ là N hoặc S; X⁴ là W hoặc Y; X⁵ là N, T hoặc S; X⁶ là T hoặc N; X⁷ là V hoặc I; X⁸ là F hoặc A; X⁹ là Y, A, V, F hoặc S; X¹⁰ là D, H, W, E, hoặc Y; X¹¹ là V, L hoặc F; X¹² là E, K hoặc Q; X¹³ là A hoặc T; và X¹⁴ là M hoặc L.

Theo một phương án cụ thể, vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm polypeptit có trình tự của SEQ ID NO:11 như dưới đây:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASX15X16X17X18X19X20VAWYQ
QKPGKAPKX21LIYX22ASX23X24X25X26GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGKLEIK

trong đó X15 là Q, A, K, hoặc H; X16 là N, A, Y, I, K, T, hoặc F; X17 là V, A, G, hoặc M; X18 là G, S, T, hoặc L; X19 là T, N, P, hoặc A; X20 là N hoặc Y; X21 là P hoặc L; X22 là S, L, hoặc W; X23 là Y, N, hoặc H; X24 là R, L, P, hoặc H; X25 là Y, S, Q, K, E, F, hoặc P; và X26 là S, G, I, hoặc R.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến các polynucleotit được phân lập mã hoá các phân tử gắn kết kháng nguyên, các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị, hoặc các polypeptit mà nó gắn kết với CEA liên kết màng. Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự mà nó mã hoá ít nhất ba chuỗi nặng CDR (ví dụ HCDR1, HCDR2, và HCDR3) và/hoặc ba chuỗi nhẹ CDR (ví dụ LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 và 217-224, hoặc các thể biến dị hoặc các dạng được làm cùn đầu của chúng chứa ít nhất các gốc xác định tính đặc hiệu (SDRs) đối với mỗi trong ba vùng xác định bổ trợ nêu trên. Theo một phương án cụ thể hơn, polynucleotit mã hoá polypeptit bao

gồm một chuỗi nặng CDR3 được chọn từ các SEQ ID NO: 217-224 và hai chuỗi nặng CDR (ví dụ HCDR1 và HCDR2) được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3, 5-10, và 12-24 và ba chuỗi nhẹ CDR (ví dụ LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chọn từ các SEQ ID NO: 36-56. Theo một phương án khác, polynucleotit mã hoá polypeptit bao gồm (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ kháng thể. Các polynucleotit mã hoá các polypeptit vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được biểu hiện ở một hoặc nhiều vật truyền biểu hiện. Theo một phương án đặc biệt hơn, polynucleotit mã hoá chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ các SEQ ID NO: 99-108, các SEQ ID NO: 188-216, và các SEQ ID NO: 225-248 được chọn từ nhóm gồm các polynucleotit được chọn từ các SEQ ID NO: 159-187 và SEQ ID NOs: 249-256 hoặc tổ hợp của chúng, trong đó, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ không được mã hoá bởi tổ hợp của SEQ ID NO:11 và SEQ ID NO:115 hoặc SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:116. Theo một phương án, các polypeptit vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hoá bởi các polynucleotit kết hợp để tạo ra kháng thể thể khảm, cụ thể hơn là kháng thể được làm giống như của người.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị, hoặc polypeptit gắn kết với CEA liên kết màng bao gồm vùng Fc. Theo một phương án cụ thể hơn, phân tử gắn kết kháng nguyên, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị, hoặc polypeptit được biến đổi di truyền bằng glycogen để có dạng glycosyl hóa biến đổi ở vùng Fc. Theo một phương án đặc biệt, ái lực đối với CEA liên kết màng của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit được gia tăng so với kháng thể PR1A3 gốc. Theo một phương án khác, độ ổn định của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit được gia tăng so với kháng thể PR1A3 gốc. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit có hoạt tính ADCC gia tăng. Theo một phương án, ADCC gia tăng của phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị hoặc polypeptit là do sự gia tăng ái lực của polypeptit đối với CEA liên kết màng, ví dụ bằng quá trình trưởng thành ái lực hoặc các phương pháp khác để cải thiện ái lực.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị, hoặc polypeptit để điều trị bệnh, đặc biệt là các rối loạn tăng sinh trong đó CEA được biểu hiện, đặc biệt là trong đó CEA được biểu hiện bất thường (ví dụ biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới dạng biệt hóa trong tế bào) so với mô bình thường của cùng loại tế bào. Các rối loạn này bao gồm, nhưng không giới hạn ở bệnh ung thư ruột kết, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy và bệnh ung thư vú. Các mức biểu hiện CEA có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và các phương pháp đó được mô tả ở đây (ví dụ bằng thử nghiệm miễn dịch hoá học mô, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch enzym, ELISA, đếm dòng tế bào, thử nghiệm chất miễn dịch phóng xạ, phép thẩm tách Tây, gắn kết phôi tử, hoạt tính kinaza, v.v.).

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người hoặc một phần hoặc mảnh của chúng mà nó gắn kết với CEA liên kết màng gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự thuộc trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 225-248. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người hoặc một phần hoặc mảnh của chúng mà nó gắn kết với CEA liên kết màng gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự thuộc trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 105, 108, hoặc 207-216. Theo một phương án đặc biệt, phân tử gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người hoặc một phần hoặc mảnh của chúng mà nó gắn kết với CEA liên kết màng gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự thuộc trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 225-248 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự thuộc trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 105, 108, hoặc 207-216. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người còn bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng người và/hoặc vùng ổn định chuỗi nhẹ người. Các vùng ổn định này được mô tả ở đây và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên được làm

giống như của người bao gồm vùng Fc, đặc biệt hơn là vùng Fc được biến đổi di truyền bằng glycogen.

Các phương pháp để làm các kháng thể không phải của người giống như của người là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các ABM được làm giống như của người theo sáng chế có thể được tạo ra theo các phương pháp trong Patent Mỹ số 5,225,539 của Winter, Patent Mỹ số 6,180,370 của Queen và các đồng tác giả, hoặc Patent Mỹ số 6,632,927 của Adair và các đồng tác giả, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Tốt hơn là, kháng thể được làm giống như của người có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào nó từ nguồn không phải của người. Các gốc axit amin không phải của người thường được đề cập tới như là các gốc “nhập”, chúng thường được lấy từ miền biến đổi “nhập”. Quá trình làm giống như của người về cơ bản được tiến hành theo phương pháp của Winter và các cộng sự (Jones và các đồng tác giả, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann và các đồng tác giả, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen và các đồng tác giả, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), bằng cách thay thế các vùng siêu biến trình tự cho các trình tự tương ứng của kháng thể người. Vì vậy, các kháng thể “được làm giống như của người” này là các kháng thể thể khảm (Patent Mỹ số 4,816,567) trong đó về cơ bản ít hơn một miền biến đổi của người nguyên vẹn được thay thế bằng trình tự tương ứng từ loại không phải của người. Thông thường, các kháng thể được làm giống như của người là các kháng thể của người trong đó một số gốc vùng siêu biến và có thể một số gốc FR được thế bằng các gốc từ các điểm tương tự trong các kháng thể không phải của người (ví dụ loài gặm nhấm). Các kháng thể đối tượng kháng CEA được làm giống như của người sẽ tùy ý bao gồm các vùng ổn định từ globulin miễn dịch người.

Việc lựa chọn các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ người để tạo ra các kháng thể được làm giống như của người là rất quan trọng để làm giảm tính kháng nguyên. Theo phương pháp được gọi là “phù hợp nhất”, trình tự của miền biến đổi của kháng thể cho (ví dụ loài gặm nhấm) được sàng lọc dựa vào thư viện tổng thể

của các trình tự miền biến đổi của người đã biết. Trình tự của người mà gần nhất với trình tự của thể cho (ví dụ loài gặm nhấm) sau đó được chấp nhận như vùng khung người (FR) cho kháng thể được làm giống như của người (Sims và các đồng tác giả, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Phương pháp khác để lựa chọn trình tự khung của người là so sánh trình tự của từng vùng phụ riêng biệt của khung cho đầy đủ (ví dụ loài gặm nhấm) (tức là FR1, FR2, FR3, và FR4) hoặc một số tổ hợp của các vùng phụ riêng biệt (ví dụ FR1 và FR2) dựa vào thư viện của các trình tự vùng biến đổi của người đã biết mà tương ứng với vùng phụ khung đó (ví dụ như được xác định bằng cách đánh số Kabat), và chọn trình tự của người cho mỗi vùng phụ hoặc tổ hợp tức là gần nhất với trình tự của loài gặm nhấm (Leung Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0040606A1, công bố 27 tháng hai, 2003). Phương pháp khác sử dụng vùng khung đặc biệt thu được từ trình tự liên ứng của tất cả các kháng thể của người thuộc nhóm phụ đặc biệt của các chuỗi nặng và nhẹ (Carter và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta và các đồng tác giả, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)). Theo một phương án, các vùng khung của người được chọn từ tập hợp của các trình tự dòng phôi người. Các tập hợp này của các trình tự dòng phôi người có thể được thấy trong các cơ sở dữ liệu như IMGT hoặc VBase. Các vùng khung có thể được chọn riêng biệt (ví dụ FR1-3 được chọn cho thể nhận đối với các vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các ABM được làm giống như của người kháng CEA có thể được mã hóa bởi các gen dòng phôi khác nhau) hoặc như một phần của cùng gen dòng phôi. Theo một phương án đặc biệt hơn nữa, chuỗi nặng FR1-3 được mã hóa bởi trình tự gen dòng phôi globulin miễn dịch của người IGHV7_4_1*02 (Lưu giữ với với số lưu giữ là X62110, SEQ ID NO:114). Theo một phương án đặc biệt khác, chuỗi nhẹ FR1-3 được mã hóa bởi trình tự gen dòng phôi globulin miễn dịch của người IMGT_hVK_1_39 (Lưu giữ với với số lưu giữ là X59315, SEQ ID NO:118). Theo một phương án đặc biệt khác, chuỗi nặng FR4 là được mã hóa bởi trình tự gen dòng phôi JH6 (xem số lưu

giữ GenBank M63030). Theo một phương án đặc biệt khác, chuỗi nhẹ FR4 là được mã hóa bởi trình tự gen dòng phôi JK2 (xem số lưu giữ GenBank X61584).

Thông thường mong muốn là các phân tử gắn kết kháng nguyên, như các kháng thể hoặc các mảnh của chúng, được làm giống như của người mà vẫn duy trì được ái lực cao đối với kháng nguyên và các đặc tính sinh học có ích khác. Vì vậy, theo một phương án, các kháng thể được làm giống như của người được tạo ra bằng cách phân tích các trình tự gốc và các sản phẩm được làm giống như của người theo khái niệm khác nhau nhờ sử dụng các kiểu ba chiều của các trình tự gốc và được làm giống như của người. Các kiểu globulin miễn dịch ba chiều thường có sẵn để sử dụng và quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chương trình máy tính sẵn có sử dụng để minh họa và thể hiện các cấu trúc cấu dạng ba chiều có thể của các trình tự globulin miễn dịch ứng cử chọn lọc. Phân tích các hiển thị đó giúp làm sáng tỏ vai trò thích hợp của các gốc trong hoạt động của trình tự globulin miễn dịch ứng cử, ví dụ phân tích các gốc mà có ảnh hưởng tới khả năng của globulin miễn dịch ứng cử để gắn kết với kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc FR có thể được chọn lựa và kết hợp từ các trình tự nhận và nhập đến mức đạt được đặc tính kháng thể mong muốn, như ái lực cao đối với (các) kháng nguyên đích. Nói chung, các gốc vùng siêu biến ảnh hưởng trực tiếp và cơ bản nhất đến gắn kết kháng nguyên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA thể biến dị và/hoặc được làm giống như của người, có ái lực hoàn thiện với các tính chất và đặc tính mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở: ái lực gắn kết mạnh đối với kháng nguyên CEA--đặc biệt là CEA liên kết màng--trong khi về căn bản không có tính phản ứng chéo với CEA tan được; khả năng để kích thích sự phân giải tế bào của các tế bào biểu hiện CEA *in vitro* và *ex-vivo*, tốt hơn là theo cách phụ thuộc liều lượng; khả năng để ức chế sự dính bám tế bào do CEA tạo ra *in vitro*; khả năng để ức chế sự phát triển mô u và/hoặc kích thích sự thoái lui mô u (ví dụ, như được chứng minh trong các dạng khối u (ví dụ chuột ghép khác loài).

Như được mô tả ở đây, theo một số phương án, các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị theo sáng chế có ái lực gắn kết, ví dụ, do quá trình hoàn thiện ái lực của kháng thể gốc bao gồm một hoặc nhiều CDR của kháng thể PR1A3. Ái lực của các phân tử gắn kết kháng nguyên và phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị theo sáng chế có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và như được mô tả ở đây. Theo một phương án cụ thể, các phân tử gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người hoặc biến dị theo sáng chế gắn kết với CEA người, tốt hơn là CEA liên kết màng, với trị số hằng số ái lực hoá trị một (K_D) không nhiều hơn khoảng $1\mu\text{M}$ đến khoảng $0,001\text{nM}$, đặc biệt hơn là không nhiều hơn khoảng 800nM đến khoảng 1nM , và thậm chí đặc biệt hơn là không nhiều hơn khoảng 550nM đến khoảng 10nM . Theo một phương án đặc biệt, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là kháng thể có ái lực hoàn thiện hoặc mảnh của chúng mà gắn kết với CEA liên kết màng với trị số hằng số ái lực hoá trị một (K_D) không nhiều hơn khoảng 100nM đến khoảng 10nM . Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là kháng thể có ái lực hoàn thiện hoặc mảnh của chúng mà gắn kết với CEA liên kết màng với trị số hằng số ái lực hoá trị một (K_D) không nhiều hơn khoảng 100nM đến khoảng $0,01\text{nM}$. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là kháng thể có ái lực hoàn thiện hoặc mảnh của chúng mà gắn kết với CEA liên kết màng với trị số hằng số ái lực hoá trị một (K_D) không nhiều hơn khoảng 100nM đến khoảng $0,1\text{nM}$. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là kháng thể có ái lực hoàn thiện hoặc mảnh của chúng mà gắn kết với CEA liên kết màng với trị số hằng số ái lực hoá trị một (K_D) bằng 100nM , 10nM , 1nM , $0,1\text{nM}$, hoặc thấp hơn. Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là kháng thể hoặc mảnh của chúng có độ ổn định hoàn thiện (được biến đổi di truyền để độ ổn định tăng) mà vẫn có ái lực gắn kết cao của dạng gốc ái lực hoàn thiện của nó. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị gắn kết với CEA liên kết màng với ái lực cao hơn nó gắn kết với CEA không liên kết. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên

biến dị gắn kết với CEA liên kết màng với ái lực cao gấp 1,5 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 10 lần, 20 lần hoặc ái lực ca hơn nó gắn kết với CEA không liên kết.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị theo sáng chế thường gắn kết cùng epitop như được nhận dạng bởi kháng thể chuột PR1A3, hoặc có thể cạnh tranh với kháng thể PR1A để gắn kết với CEA liên kết màng. Để sàng lọc các kháng thể gắn kết với epitop trên CEA người được gắn kết bởi kháng thể xem xét (ví dụ các loại mà chúng phong bế gắn kết của kháng thể PR1A3 với CEA người), thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu ANTIBODIES A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane eds. (1988), có thể được tiến hành. Theo cách khác, lập bản đồ epitop, ví dụ như được mô tả trong tài liệu Champe và các đồng tác giả, J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995), có thể được tiến hành để xác định liệu có kháng thể gắn kết với epitop xem xét không.

Theo một phương án, các phân tử gắn kết kháng nguyên thể biến dị đặc hiệu đối với CEA người được tạo ra từ phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA gốc bao gồm ít nhất một CDR của kháng thể đơn dòng PR1A3, trong đó kháng thể kháng CEA gốc gắn kết cùng epitop như kháng thể PR1A3 và có khả năng cạnh tranh với PR1A3 để gắn kết kháng nguyên. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên gốc bao gồm ít nhất một, hai, hoặc thường là ba chuỗi nặng CDR của kháng thể PR1A3; theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên gốc bao gồm ít nhất một, hai, hoặc thường là ba chuỗi nhẹ CDR của kháng thể PR1A3; theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên gốc bao gồm ba chuỗi nặng CDR và ba chuỗi nhẹ CDR của kháng thể PR1A3. Tốt hơn là, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm HCDR1 của PR1A3, HCDR1 này bao gồm thay thế glutamat cho valin tại vị trí Kabat 31. Các ABM thể biến dị thường có ái lực đối với CEA lớn hơn các ABM gốc. Theo một phương án, các ABM thể biến dị có độ ổn định tăng như so với các ABM gốc. Theo một phương án, ABM thể biến dị bao gồm vùng Fc. Theo một phương án, ABM thể biến dị được biến đổi di truyền bằng

glycogen. Theo một phương án, ABM thể biến dị có hoạt tính ADCC tăng so với ABM gốc. Theo một phương án đặc biệt, ADCC tăng do ái lực tăng, đạt được bằng quá trình hoàn thiện ái lực của ABM gốc để tạo ra ABM thể biến dị chẳng hạn. Theo một phương án đặc biệt hơn nữa, sự gia tăng ADCC bằng ít nhất khoảng 40% đến khoảng 100% như so với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc nêu trên. Theo một phương án đặc biệt khác, ABM thể biến dị làm tăng ADCC tới ít nhất khoảng 10% đến khoảng 100% trong thử nghiệm độc tính tế bào in vitro. Theo một phương án đặc biệt hơn, ABM thể biến dị có hiệu lực gấp ít nhất khoảng từ 10 lần đến khoảng 1000 lần khi kích thích ADCC với nồng độ đã cho so với kháng thể chuột PR1A3. Theo một phương án đặc biệt khác, hoạt tính ADCC tăng là nhờ biến đổi di truyền bằng glycogen vùng Fc. Theo một phương án đặc biệt khác, hoạt tính ADCC tăng là do sự kết hợp của ái lực tăng và kỹ thuật biến đổi di truyền bằng glycogen.

Theo một phương án, các phân tử gắn kết kháng nguyên thể biến dị theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong ít nhất một CDR. Số lượng (các) thay thế axit amin có thể nằm trong khoảng từ một đến mười (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10), tốt hơn là từ hai đến năm (ví dụ 2, 3, 4, hoặc 5). Theo một phương án, ít nhất một chuỗi nặng CDR bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin. Theo một phương án khác, ít nhất một chuỗi nhẹ CDR bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin. Theo một phương án khác, ít nhất một chuỗi nặng CDR bao gồm một hoặc nhiều thay thế, và ít nhất một chuỗi nhẹ CDR bao gồm một hoặc nhiều thay thế. Tốt hơn là, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm HCDR1 của PR1A3, HCDR1 này bao gồm một thay thế glutamat cho valin tại vị trí Kabat 31.

Các cải biến quan trọng về các đặc tính sinh học của các phân tử gắn kết kháng nguyên được thực hiện bằng cách chọn lọc các thay thế mà khác đáng kể về hiệu lực của chúng để duy trì (a) cấu trúc của khung chính polypeptit ở vùng thay thế, ví dụ, như cấu hình dạng tấm hoặc dạng xoắn, (b) tính tích điện hoặc kỵ nước của phân tử tại điểm đích, hoặc (c) sự trương nở của chuỗi bên. Các phân tử gắn kết

kháng nguyên thể biến dị bao gồm các thay thế các axit amin có thể có các hoạt tính sinh học tăng, ví dụ, ái lực gắn kết kháng nguyên cải thiện và ADCC tăng cường, so với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Các thay thế axit amin có thể được đưa vào bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự gây đột biến định hướng điểm và/hoặc quá trình hoàn thiện ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc ví dụ bằng cách thể hiện thể thực khuẩn.

Để nhận dạng các điểm ứng cử, ví dụ các gốc vùng siêu biến, để cải biến, sự gây đột biến quét alanin có thể được tiến hành để tìm các gốc mà tham gia đáng kể vào gắn kết kháng nguyên. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể có lợi khi phân tích cấu trúc tinh thể của phức hệ kháng nguyên-kháng thể để nhận dạng các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và CEA người. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lảng giềng là các ứng cử để thay thế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và/hoặc được mô tả ở đây. Khi các thể biến dị này được tạo ra, nhóm các thể biến dị có thể được sàng lọc bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và/hoặc được mô tả ở đây và các kháng thể với các đặc tính tốt hơn trong một hoặc nhiều thử nghiệm thích hợp có thể được chọn lọc để phát triển thêm.

Hiện thị thể thực khuẩn có thể được sử dụng để tạo ra tập hợp các trình tự vùng siêu biến từ phân tử gắn kết kháng nguyên gốc chứa (các) đột biến axit amin ngẫu nhiên. Ví dụ, một vài điểm ở vùng siêu biến (ví dụ 6-7 điểm) được tạo đột biến để làm phát sinh các thay thế amino có thể tại mỗi điểm. Theo cách khác, sự gây đột biến ngẫu nhiên có thể được thực hiện đối với các vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Các đột biến có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm nhưng không giới hạn ở sử dụng các đoạn mồi phát sinh đột biến, kiểm soát số lượng các chu trình và sử dụng các chất tương tự nucleotit tạo đột biến 8-oxo-dGTP và dPTP trong quá trình khuếch đại PCR. Vì vậy, các thể biến dị kháng thể đã phát sinh được thể hiện dưới dạng hoá trị một từ các thể thực bào nhỏ dạng sợi khi dung hợp với sản phẩm gen III của M13 được

bọc trong mỗi thể thực bào nhỏ. Các thể biến dị thể hiện thể thực khuẩn sau đó được sàng lọc về các hoạt tính sinh học của chúng (ví dụ ái lực gắn kết) như được thể hiện ở đây và các ứng cử mà có một hoặc nhiều hoạt tính cải thiện sẽ được sử dụng để phát triển thêm. Các phương pháp để tạo ra các thư viện hiển thị thể thực khuẩn có thể được thấy trong tài liệu Huse và các đồng tác giả, *Science*, 246:1275-1281 (1989); *Proc. Nat'l Acad. Sci, USA*, 88:4363-4366 (1991), toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Phương pháp khác để nhận biết các phân tử gắn kết kháng nguyên có ái lực hoàn thiện có thể được thấy trong Patent Mỹ số 7,432,063 cấp cho Balint và các đồng tác giả chẳng hạn.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết kháng nguyên và các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị theo sáng chế bao gồm vùng Fc, tốt hơn là vùng Fc người. Các trình tự và các cấu trúc của các vùng Fc là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả. Theo một phương án đặc biệt, vùng ổn định của người là IgG1, như nêu trong các SEQ ID NO: 121 và 122.

Tuy nhiên, các thể biến dị và các isoform của vùng Fc người cũng bao gồm trong sáng chế. Ví dụ, các vùng Fc biến dị thích hợp để sử dụng trong sáng chế có thể được tạo ra theo các phương pháp chỉ dẫn trong Patent Mỹ số 6,737,056 cấp cho Presta (các thể biến dị vùng Fc với chức năng tác động thay đổi do một hoặc nhiều cải biến axit amin); hoặc trong các đơn xin cấp patent Mỹ số 60/439,498; 60/456,041; 60/514,549; hoặc công bố đơn quốc tế WO 2004/063351 (các vùng biến dị Fc có ái lực gắn kết tăng so với cải biến axit amin); hoặc trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 10/672,280 hoặc công bố đơn quốc tế WO 2004/099249 (các thể biến dị Fc có gắn kết biến đổi với FcγR do sự cải biến axit amin), toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một phương án đặc biệt, các ABM và các ABM thể biến dị kháng CEA bao gồm vùng Fc mà được biến đổi di truyền bằng glycogen để làm biến đổi hoạt tính chức tác động của ABM (ví dụ sự fucosyl hoá giảm, cải thiện Fc ái lực gắn kết thụ thể, tăng ADCC, v.v.). Các

phương pháp trong kỹ thuật biến đổi di truyền bằng glycogen có thể được sử dụng được mô tả chi tiết dưới đây và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị theo sáng chế được tiếp hợp với gốc khác, như chất đồng vị đánh dấu phóng xạ hoặc độc tố. Các phân tử gắn kết kháng nguyên tiếp hợp này có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thể tiếp hợp ABM kháng CEA theo sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây trong phần có tiêu đề "Các thể tiếp hợp phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA." ("Anti-CEA Antigen Binding Molecule Conjugates.").

Các vật truyền biểu hiện và các tế bào chủ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vật truyền biểu hiện và/hoặc tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit được phân lập theo sáng chế. Ví dụ, tế bào chủ hoặc vật truyền biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit hoặc các polynucleotit mã hóa các polypeptit, các ABM và/hoặc ABM biến dị được mô tả ở đây. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để tạo ra ABM mà gắn kết với CEA liên kết màng người, phương pháp này bao gồm: nuôi cấy tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit được phân lập theo sáng chế hoặc vật truyền biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit được phân lập theo sáng chế trong môi trường dưới các điều kiện cho phép biểu hiện một hoặc nhiều polynucleotit đã nêu, trong đó một hoặc nhiều polynucleotit đã nêu mã hóa một hoặc nhiều polypeptit mà tạo ra một phần ABM; và thu hồi ABM này, trong đó ABM này hoặc một phần của chúng gắn kết với CEA liên kết màng.

Nói chung, loại bất kỳ của dòng tế bào nuôi cấy có thể được sử dụng để biểu hiện ABM theo sáng chế. Theo một phương án ưu tiên, các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NS0, các tế bào Sp2/0, các tế bào u tủy YO, các tế bào u tủy chuột P3X63, các tế bào PER, các tế bào PER.C6 hoặc các tế bào lai, các tế bào động vật

có vú khác, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào thực vật được sử dụng làm dòng tế bào gốc để tạo ra các tế bào chủ được biến đổi di truyền được mô tả ở đây.

Theo một phương án đặc biệt, tế bào chủ hoặc vật truyền biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa ABM kháng CEA như được đề xuất ở đây. Theo một phương án, kháng thể có ái lực hoàn thiện. Kháng thể có ái lực hoàn thiện thường có ái lực gắn kết tăng hơn ái lực gắn kết của kháng thể tham khảo mà từ đó thu được kháng thể có ái lực hoàn thiện. Theo một phương án khác, kháng thể có các đặc tính chữa bệnh mong muốn bao gồm nhưng không giới hạn ở: ái lực gắn kết mạnh đối với kháng nguyên CEA, đặc biệt là CEA liên kết màng, trong khi về cơ bản không có tính phản ứng chéo với CEA tan được; khả năng để kích thích sự phân giải tế bào của các tế bào biểu hiện CEA in vitro và ex-vivo, tốt hơn là theo cách phụ thuộc liều lượng; khả năng để ức chế sự dính bám tế bào do CEA tạo ra in vitro; khả năng để ức chế sự phát triển mô u và/hoặc kích thích sự thoái lui mô u trong các dạng khối u ở chuột nhắt (ví dụ chuột được ghép khác loài). Theo một phương án khác, kháng thể có độ ổn định tăng như so với kháng thể gốc mà từ đó thu được kháng thể có độ ổn định hơn. Theo một phương án khác, kháng thể thể biến dị hoặc mảnh của chúng bao gồm Fc của người.

Theo một phương án, một hoặc một vài polynucleotit mã hóa ABM theo sáng chế có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cấu thành hoặc, lần lượt, hệ biểu hiện điều chỉnh. Các hệ biểu hiện điều chỉnh thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hệ biểu hiện điều chỉnh tetracyclin, hệ biểu hiện có thể kích thích bởi ecdyson, hệ biểu hiện chuyển nhựa sơn, hệ biểu hiện có thể kích thích bởi glucocorticoid, hệ gen khởi đầu có thể kích thích bởi nhiệt độ, và hệ biểu hiện có thể kích thích bởi metallothionein kim loại. Nếu một vài axit nucleic khác nhau mã hóa ABM theo sáng chế nằm trong hệ tế bào chủ thì một số trong đó có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cấu thành, trong khi các loại khác được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu điều chỉnh. Mức biểu hiện

tối đa được cho là mức biểu hiện polypeptit ổn định có thể cao nhất mà không có tác dụng phụ đáng kể đối với tốc độ sinh trưởng tế bào, và sẽ được xác định nhờ thử nghiệm thông thường. Các mức biểu hiện được xác định bằng các phương pháp thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm phân tích phép thẩm tách Tây nhờ sử dụng kháng thể đặc hiệu cho ABM hoặc kháng thể đặc hiệu đối với đầu peptit dung hợp với ABM; và phân tích phép thẩm tách Bắc. Theo cách khác, polynucleotit có thể liên kết động với gen báo cáo; các mức biểu hiện ABM thể hiện ở đây được xác định bằng cách đo tín hiệu liên quan đến mức biểu hiện của gen báo cáo. Gen báo cáo có thể được phiên mã cùng với (các) axit nucleic mã hóa ABM này như phân tử ARN thông tin đơn; các trình tự mã hóa tương ứng có thể được liên kết động hoặc bằng điểm vào ribosom nội (IRES) hoặc bằng gen tăng cường dịch mã không phụ thuộc cap (CITE). Gen báo cáo có thể được dịch mã cùng với ít nhất một axit nucleic mã hóa ABM đề cập ở đây như thể chuỗi polypeptit đơn được tạo ra. Các axit nucleic mã hóa ABM theo sáng chế có thể liên kết động với gen báo cáo dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu đơn, như thể axit nucleic mã hóa ABM và gen báo cáo được phiên mã vào phân tử ARN mà được tách intron theo cách khác vào hai phân tử ARN thông tin riêng biệt (mRNA); một trong các ARN thông tin thu được được dịch mã vào protein báo cáo nêu trên, và ARN còn lại được dịch mã vào ABM.

Các phương pháp mà đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để cấu trúc các vật truyền biểu hiện chứa trình tự mã hóa của ABM kháng CEA được đề xuất ở đây cùng với các tín hiệu phiên mã/dịch mã thích hợp. Các phương pháp đó bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN in vitro, các kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp in vivo/tái tổ hợp di truyền. Xem, ví dụ các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu Maniatis và các đồng tác giả, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) và Ausubel và các đồng tác giả, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989).

Các hệ vật truyền biểu hiện vật chủ có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự mã hóa của các ABM theo sáng chế. Tốt hơn là, các tế bào động vật có vú được sử dụng làm các hệ tế bào chủ chuyển nhiễm với ADN plasmit tái tổ hợp hoặc các vật truyền biểu hiện ADN cosmid chứa trình tự mã hóa của protein xem xét và trình tự mã hóa của polypeptit dung hợp. Tốt nhất là, các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NS0, các tế bào Sp2/0, các tế bào u tủy YO, các tế bào u tủy chuột P3X63, các tế bào PER, các tế bào PER.C6 hoặc các tế bào lai, các tế bào động vật có vú khác, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào thực vật được sử dụng làm hệ tế bào chủ. Một số ví dụ về các hệ biểu hiện và các phương pháp chọn lọc được mô tả trong các tài liệu tham khảo dưới đây và các tài liệu tham khảo viện dẫn trong đó: Borth và các đồng tác giả, *Biotechnol. Bioen.* 71(4):266-73 (2000-2001), trong tài liệu Werner và các đồng tác giả., *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80 (1998), trong tài liệu Andersen and Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123 (2002), trong tài liệu Chadd and Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001), và trong tài liệu Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001).

Theo các phương án khác, các hệ tế bào chủ có nhân điển hình khác có thể được sử dụng, bao gồm các tế bào nấm men biến nạp bằng các vật truyền biểu hiện nấm men tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa của ABM theo sáng chế, như các hệ biểu hiện được chỉ dẫn trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/344,169 và công bố đơn quốc tế WO 03/056914 (các phương pháp để tạo ra glycoprotein tương tự người trong tế bào chủ có nhân điển hình không phải của người) (toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn); các hệ tế bào côn trùng nhiễm các vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ baculovirus) chứa trình tự mã hóa của kháng CEA; các hệ tế bào thực vật nhiễm các vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ virus khảm hoa lơ, CaMV; virus khảm cây thuốc lá, TMV) hoặc biến nạp các vật truyền biểu hiện plasmit tái tổ hợp (ví dụ plasmit Ti) chứa trình tự mã hóa của ABM theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các hệ biểu hiện chỉ dẫn trong patent Mỹ số 6,815,184 (các phương pháp để biểu hiện và tiết xuất các

polypeptit có hoạt tính sinh học từ bào tằm được xử lý bằng công nghệ di truyền); công bố đơn quốc tế WO 2004/057002 (quá trình tạo ra các protein glycosyl hóa trong các tế bào thực vật dạng rêu bằng cách đưa vào gen glycosyl transferaza) và công bố đơn quốc tế WO 2004/024927 (các phương pháp để tạo ra protein không phải thực vật khác loại ngoại bào ở thể nguyên sinh rêu) và các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/365,769, 60/368,047, và công bố đơn quốc tế WO 2003/078614 (xử lý glycoprotein trong thực vật chuyển gen bao gồm enzym chức động vật có vú GnTIII) (toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn); hoặc các hệ tế bào động vật nhiễm các vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ adenovirus, virus bệnh đậu bò) bao gồm các dòng tế bào được biến đổi di truyền để chứa các bản sao của ADN mã hóa ABM thể kháng CEA hoặc được khuếch đại ổn định (CHO/dhfr) hoặc khuếch đại không ổn định trong nhiễm sắc thể rất nhỏ kép (ví dụ các dòng tế bào chuột). Theo một phương án, vật truyền bao gồm (các) polynucleotit mã hóa ABM theo sáng chế là đa gen. Ngoài ra, theo một phương án, ABM thảo luận ở trên là kháng thể hoặc mảnh của chúng. Theo một phương án, ABM là kháng thể có ái lực hoàn thiện. Theo một phương án, ABM là kháng thể có độ ổn định hoàn thiện.

Nói chung biểu hiện ổn định được ưu tiên hơn biểu hiện tạm thời do nó thường đạt được các kết quả tái sản xuất nhiều hơn và còn thích ứng hơn với quy mô công nghiệp; tuy nhiên, nằm trong kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để xác định liệu biểu hiện tạm thời có tốt hơn đối với trạng thái cụ thể không. Thay vì sử dụng các vật truyền biểu hiện chứa các gốc sao chép virus, các tế bào chủ có thể được biến nạp với các axit nucleic mã hoá tương ứng được kiểm soát bởi các phần tử điều khiển biểu hiện thích hợp (ví dụ gen khởi đầu, gen tăng cường, các trình tự, các gen kết thúc phiên mã, các điểm polyadenyl hóa, v.v..) và dấu chuẩn có thể chọn lọc được. Sau khi đưa vào ADN lạ, các tế bào được biến đổi di truyền có thể được cho phép sinh trưởng trong 1-2 ngày trong môi trường giàu dinh dưỡng, và sau đó được chuyển đổi thành môi trường chọn lọc.

Dấu chuẩn có thể chọn lọc được trong plasmit tái tổ hợp tạo ra khả năng chống lại việc chọn lọc và cho phép chọn lọc các tế bào mà đã gắn kết ổn định plasmit vào các nhiễm sắc thể của chúng và sinh trưởng để tạo ra các tiêu điểm mà lần lượt có thể được tách dòng nuôi cấy và mở rộng vào các dòng tế bào.

Số lượng các hệ chọn lọc có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các gen thymidin kinaza virut ecpet (Wigler và các đồng tác giả, *Cell* 11:223 (1977)), hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)), và adenin phosphoribosyltransferaza (Lowy và các đồng tác giả, *Cell* 22:817 (1980)), chúng có thể được sử dụng trong các tế bào tk⁻, hgp⁺ hoặc Apr⁺ tương ứng. Ngoài ra, tính chống kháng chuyển hoá có thể được sử dụng làm cơ sở để chọn lọc đối với dhfr, nó tạo ra tính kháng metotrexat (Wigler và các đồng tác giả, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567 (1989); O'Hare và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); gpt, tạo ra tính kháng axit mycophenolic (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, tạo ra tính kháng aminoglycosit G-418 (Colberre-Garapin và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)); và hyg⁺ mà nó tạo ra tính kháng các gen hygromyxin (Santerre và các đồng tác giả, *Gene* 30:147 (1984)). Mới đây, các gen có thể chọn lọc khác được mô tả, cụ thể là trpB, gen này cho phép các tế bào sử dụng indol thay thế cho tryptophan; hisD mà nó cho phép các tế bào sử dụng histinol thay thế cho histidin (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047 (1988)); hệ glutamin synthaza; và ODC (ornithin decarboxylaza) mà tạo ra tính kháng chất ức chế ornithin decarboxylaza, 2-(diflometyl)-DL-ornithin, DFMO (McConlogue, trong tài liệu: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp để cải biến dạng glycosyl hóa của các ABM theo sáng chế mà được tạo ra bởi tế bào chủ, bao gồm biểu hiện trong tế bào chủ đã nêu axit nucleic mã hóa ABM theo sáng chế và axit nucleic mã hóa polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza, hoặc vật truyền bao gồm các axit

nucleic này. Các gen có hoạt tính glycosyltransferaza bao gồm $\beta(1,4)$ -N-axetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII), α -manosidaza II (ManII), $\beta(1,4)$ -galactosyltransferaza (GalT), $\beta(1,2)$ -N-axetylglucosaminyltransferaza I (GnTI), và $\beta(1,2)$ -N-axetylglucosaminyltransferaza II (GnTII). Theo một phương án, tổ hợp của các gen có hoạt tính glycosyltransferaza được biểu hiện trong tế bào chủ (ví dụ GnTIII và Man II). Tương tự, phương pháp còn bao gồm biểu hiện một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa ABM ở tế bào chủ trong đó gen glycosyltransferaza được làm đứt gãy hoặc theo cách khác được khử hoạt tính (ví dụ tế bào chủ trong đó hoạt tính của gen mã hóa fucosyltransferaza nhân $\alpha 1-6$ được loại bỏ). Theo một phương án khác, các ABM theo sáng chế có thể được tạo ra trong tế bào chủ mà còn biểu hiện polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính GnTIII để cải biến dạng glycosyl hóa. Theo một phương án đặc biệt, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit dung hợp bao gồm miền định vị Golgi của polypeptit ở trong Golgi. Theo một phương án ưu tiên khác, biểu hiện của các ABM theo sáng chế trong tế bào chủ mà biểu hiện polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính GnTIII làm cho các ABM có ái lực gắn kết thụ thể Fc cao và chức năng tác động cao. Vì vậy, theo một phương án, sáng chế đề cập đến tế bào chủ bao gồm (a) axit nucleic được phân lập bao gồm trình tự mã hóa polypeptit có hoạt tính GnTIII; và (b) polynucleotit được phân lập mã hóa ABM theo sáng chế, như kháng thể thể khảm, được làm giống như của động vật linh trưởng hoặc được làm giống như của người mà có thể gắn kết với CEA người. Theo một phương án ưu tiên, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit dung hợp bao gồm miền xúc tác của GnTIII và miền định vị Golgi là miền định vị của manosidaza II. Các phương pháp làm phát sinh các polypeptit dung hợp này và việc sử dụng chúng để tạo ra các kháng thể có các chức năng tác động cao được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời số 60/495,142 và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/0241817, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một phương án đặc biệt, ABM đã cải biến được tạo ra bằng tế bào chủ có vùng ổn định IgG hoặc mảnh của chúng bao gồm vùng

Fc. Theo một phương án đặc biệt khác, ABM là kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh của chúng bao gồm vùng Fc.

Các ABM có glycosyl hóa thay đổi được tạo ra bằng các tế bào chủ theo sáng chế thường có ái lực gắn kết thụ thể Fc cao và/hoặc chức năng tác động cao do sự cải biến tế bào chủ (ví dụ bằng cách biểu hiện gen glycosyltransferaza). Tốt hơn, nếu ái lực gắn kết thụ thể Fc cao là gắn kết với thụ thể hoạt hoá Fcγ tăng, như thụ thể FcγRIIIa. Tốt hơn nếu chức năng tác động cao là sự gia tăng về một hoặc nhiều chức năng dưới đây: độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể tăng, sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCP), tiết xuất xytokin tăng, hấp thụ kháng nguyên do phức hệ miễn dịch tạo ra tăng nhờ các tế bào thể hiện kháng nguyên, độc tính tế bào do Fc tạo ra tăng, gắn kết với các tế bào NK tăng, gắn kết với các đại thực bào tăng, gắn kết với các tế bào nhiều dạng nhân tăng (PMNs), gắn kết với các bạch cầu đơn nhân to tăng, liên kết ngang của các kháng thể gắn kết đích tăng, truyền tín hiệu trực tiếp kích thích sự chết theo chương trình tăng, quá trình trưởng thành tế bào dạng cây tăng, và miễn cảm sơ bộ tế bào T tăng.

Quá trình hình thành và sử dụng các ABM có chức năng tác động cao bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các glycoform của các ABM kháng CEA (ví dụ các ABM biến dị) bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể. Kỹ thuật di truyền glycosyl hóa các kháng thể đã được mô tả trước đó. Xem, ví dụ patent Mỹ số 6,602,684, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp để tạo ra các ABM từ các tế bào chủ mà có hoạt tính của các gen biến đổi bao gồm glycosyl hóa cũng được mô tả chi tiết ở đây (Xem, ví dụ phần trước có tiêu đề "Các vật truyền biểu hiện và các tế bào chủ" - "Expression Vectors and Host Cells")). Các gia tăng ADCC của các ABM theo sáng chế cũng có thể đạt được bằng cách tăng ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên đối với CEA liên kết màng, ví dụ bằng quá trình hoàn thiện ái lực hoặc các phương pháp khác để cải

thiện ái lực (xem tài liệu Tang và các đồng tác giả, *J. Immunol.* 2007, 179:2815-2823). Các hệ thống của các phương pháp đó cũng bao gồm trong sáng chế.

Các thử nghiệm lâm sàng của các kháng thể đơn dòng không tiếp hợp (mAbs) để điều trị một số dạng bệnh ung thư gần đây đã thu được các kết quả đáng khích lệ. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997); Deo và các đồng tác giả, *Immunology Today* 18:127 (1997). IgG1 thể khảm, không tiếp hợp đã được chấp nhận đối với u lympho không phải Hodgkin tế bào B nang hoặc cấp thấp. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), trong khi mAb không tiếp hợp khác, IgG1 được làm giống như của người nhằm vào các khối u rắn, cũng thể hiện các kết quả đầy hứa hẹn trong các thử nghiệm lâm sàng pha III. Deo và các đồng tác giả, *Immunology Today* 18:127 (1997). Các kháng nguyên của hai mAb đó được biểu hiện ở mức độ cao trong các tế bào u tương ứng của chúng và các kháng thể gây ra sự tàn phá khối u mạnh mẽ bằng các tế bào tác động in vitro và in vivo. Trái lại, nhiều mAb không tiếp hợp khác có các tính đặc hiệu khối u ít không thể khởi động các chức năng tác động tiềm năng đủ để sử dụng lâm sàng. Frost và các đồng tác giả, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus và các đồng tác giả, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). Đối với một số trong các mAb yếu đó, liệu pháp xytokin bổ sung hiện đang được thử nghiệm. Việc bổ sung các xytokin có thể kích thích độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) bằng cách làm tăng hoạt tính và số lượng các tế bào lympho luân chuyển. Frost và các đồng tác giả, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus và các đồng tác giả, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). ADCC, một tác động phân giải đối với các tế bào đích, được khởi động nhờ gắn kết của các thụ thể bạch cầu với vùng ổn định (Fc) của các kháng thể. Deo và các đồng tác giả, *Immunology Today* 18:127 (1997).

Một phương pháp khác, nhưng bổ sung để làm tăng hoạt tính ADCC của các IgG1 không tiếp hợp là biến đổi di truyền vùng Fc của kháng thể. Các nghiên cứu biến đổi di truyền protein chứng tỏ rằng các FcγR tương tác với vùng bản lề thấp của miền IgG CH2. Lund và các đồng tác giả, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996).

Tuy nhiên, gắn kết Fc γ R cũng cần sự có mặt của các oligosacarit gắn kết cộng hóa trị tại Asn 297 bảo toàn trong vùng CH2. Lund và các đồng tác giả, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996); Wright and Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31 (1997), gợi ý rằng hoặc oligosacarit và polypeptit cả hai trực tiếp góp phần vào điểm tương tác hoặc oligosacarit là cần thiết để duy trì cấu dạng CH2 polypeptit hoạt tính. Bởi vậy, việc cải biến cấu trúc oligosacarit có thể được nghiên cứu như cách để làm tăng ái lực của tương tác.

Phân tử IgG mang hai oligosacarit liên kết N trong vùng Fc của nó, một oligosacarit liên kết N trên từng chuỗi nặng. Liên quan đến glycoprotein bất kỳ, kháng thể được tạo ra như tập hợp của các glycoform có chung cùng polypeptit khung chính nhưng có các oligosacarit khác nhau gắn kết với các điểm glycosyl hóa. Các oligosacarit thường được thấy trong vùng Fc của IgG trong huyết thanh là loại phức hệ hai râu (Wormald và các đồng tác giả, *Biochemistry* 36:130-38 (1997), với mức thấp của axit sialic và N-axetylglucosamin cắt đôi (GlcNAc), và mức độ biến đổi của quá trình galactosyl hóa cuối cùng và fucosyl hoá nhân. Một số nghiên cứu gợi ý rằng cấu trúc hydrat cacbon tối thiểu cần thiết để gắn kết Fc γ R nằm trong nhân oligosacarit. Lund và các đồng tác giả, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996).

Các dòng tế bào có nguồn gốc từ chuột đồng hoặc chuột nhắt được sử dụng trong lĩnh vực công nghiệp và giới học viện để tạo ra các mAb chữa bệnh không tiếp hợp thường gắn kết các yếu tố xác định oligosacarit cần thiết với các điểm Fc. Tuy nhiên, các IgG biểu hiện trong các dòng tế bào đó thiếu, GlcNAc cắt đôi được thấy với các lượng ở mức thấp trong các IgG huyết thanh. Lifely và các đồng tác giả, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). Trái lại, mới đây đã thấy rằng IgG1 được làm giống như của người, do u tủy chuột tạo ra (CAMPATH-1H) mang GlcNAc cắt đôi trong một số glycoform của nó. Lifely và các đồng tác giả, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). Kháng thể có nguồn gốc tế bào chuột đạt được hoạt tính ADCC in vitro tương tự tối đa như các kháng thể CAMPATH-1H được tạo ra trong các dòng tế bào chuẩn, nhưng với các nồng độ kháng thể thấp hơn đáng kể.

Kháng nguyên CAMPATH thông thường biểu hiện ở các mức cao đối với các tế bào u lympho, và thể khảm mAb này có hoạt tính ADCC cao khi không có GlcNAc cắt đôi. Lifely và các đồng tác giả., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). Trong quá trình glycosyl hóa liên kết N, GlcNAc cắt đôi được thêm vào theo GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986).

Các nghiên cứu trước đó sử dụng dòng tế bào CHO tạo ra kháng thể, đơn mà được biến đổi di truyền trước đó để biểu hiện, dưới dạng điều chỉnh theo bề ngoài, các mức khác nhau của gen enzym GnTIII đã tách dòng nuôi cấy (Umaña, P., và các đồng tác giả., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Phương pháp này được thiết lập trước tiên về mối liên hệ chính xác giữa sự biểu hiện của glycosyltransferaza (ví dụ GnTIII) và hoạt tính ADCC của kháng thể đã cải biến. Vì vậy, sáng chế dự tính ABM biến dị (ví dụ ABM có ái lực hoàn thiện) mà gắn kết với CEA liên kết màng, bao gồm vùng Fc hoặc vùng tương đương với vùng Fc có quá trình glycosyl hóa biến đổi do sự thay đổi mức biểu hiện của gen glycosyltransferaza trong tế bào chủ tạo ra ABM. Theo một phương án đặc biệt, sự thay đổi về mức biểu hiện gen là sự gia tăng về hoạt tính GnTIII. Hoạt tính GnTIII tăng tạo ra sự gia tăng về tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit cắt đôi, cũng như giảm về tỷ lệ phần trăm của các gốc fucoza, trong vùng Fc của ABM. Kháng thể này, hoặc mảnh của chúng, có ái lực gắn kết thụ thể Fc cao và chức năng tác động cao.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp để tạo ra ABM kháng CEA theo sáng chế có các oligosacarit cải biến, bao gồm (a) nuôi cấy tế bào chủ được biến đổi di truyền để biểu hiện ít nhất một axit nucleic mã hóa polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza trong các điều kiện mà cho phép cho quá trình tạo ra ABM theo sáng chế, trong đó polypeptit này có hoạt tính glycosyltransferaza được biểu hiện với lượng đủ để cải biến các oligosacarit trong vùng Fc của ABM đã nêu được tạo ra bởi tế bào chủ này; và (b) phân lập ABM này. Theo một phương án, polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza là GnTIII. Theo một phương án khác, có hai

polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza. Theo một phương án đặc biệt, hai peptit có hoạt tính glycosyltransferaza là GnTIII và ManII. Theo một phương án khác, polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza là polypeptit dung hợp bao gồm miền xúc tác của GnTIII. Theo một phương án đặc biệt hơn nữa, polypeptit dung hợp còn bao gồm miền định vị Golgi của polypeptit trong Golgi. Tốt hơn là, miền định vị Golgi là miền định vị của manosidaza II hoặc GnTI. Theo cách khác, miền định vị Golgi được chọn từ nhóm gồm có: miền định vị của manosidaza I, miền định vị của GnTII, miền định vị của fucosyltransferaza nhân α 1-6. Các ABM được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế có ái lực gắn kết thụ thể Fc cao và/hoặc chức năng tác động cao. Nói chung, chức năng tác động cao là một hoặc nhiều chức năng tác động dưới đây: độc tính tế bào do Fc tạo ra tăng (bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể tăng), sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCP), tiết xuất xytokin tăng, hấp thụ kháng nguyên do phức hệ miễn dịch tạo ra tăng nhờ các tế bào thể hiện kháng nguyên, gắn kết với các tế bào NK tăng, gắn kết với các đại thực bào tăng, gắn kết với các bạch cầu đơn nhân to tăng, gắn kết với các tế bào nhiều dạng nhân tăng, truyền tín hiệu trực tiếp kích thích sự chết theo chương trình tăng, liên kết ngang của các kháng thể gắn kết đích tăng, quá trình trưởng thành tế bào dạng cây tăng, hoặc miễn cảm sơ bộ tế bào T tăng. Tốt hơn nếu ái lực gắn kết thụ thể Fc cao là gắn kết tăng với các thụ thể hoạt hóa Fc như Fc γ RIIIa. Theo một phương án ưu tiên đặc biệt, ABM là kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh của chúng.

Theo một phương án, tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit liên kết N cắt đôi trong vùng Fc của ABM bằng ít nhất khoảng 10% đến khoảng 100%, đặc biệt là bằng ít nhất khoảng 50%, đặc biệt hơn, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, hoặc ít nhất khoảng 90-95% của toàn bộ các oligosacarit. Theo một phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế có tỷ lệ các oligosacarit không fucosyl hóa tăng trong vùng Fc là do sự cải biến các oligosacarit

của nó bằng các phương pháp theo sáng chế. Theo một phương án, tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit không fucosyl hóa bằng ít nhất khoảng 20% đến khoảng 100%, đặc biệt là ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60% đến khoảng 70%, và đặc biệt hơn, ít nhất khoảng 75%. Các oligosacarit không fucosyl hóa có thể có dạng lai hoặc phức hệ. Theo một phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế có tỷ lệ các oligosacarit cắt đôi tăng trong vùng Fc do sự cải biến các oligosacarit của nó bằng các phương pháp theo sáng chế. Theo một phương án, tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit cắt đôi bằng ít nhất khoảng 20% đến khoảng 100%, đặc biệt là ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60% đến khoảng 70%, và đặc biệt hơn, ít nhất khoảng 75%. Theo một phương án ưu tiên đặc biệt, ABM được tạo ra bằng các tế bào chủ và các phương pháp theo sáng chế có tỷ lệ các oligosacarit không fucosyl hóa, cắt đôi tăng trong vùng Fc. Các oligosacarit không fucosyl hóa, cắt đôi có thể hoặc là dạng lai hoặc phức hệ. Đặc biệt, các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên trong đó ít nhất khoảng 10% đến khoảng 100%, đặc biệt là ít nhất khoảng 15%, đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 20% đến khoảng 50%, đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 20% đến khoảng 25%, và đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 30% đến khoảng 35% các oligosacarit trong vùng Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị được cắt đôi, không fucosyl hóa. Các ABM theo sáng chế có thể còn bao gồm vùng Fc trong đó ít nhất khoảng 10% đến khoảng 100%, đặc biệt là ít nhất khoảng 15%, đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 20% đến khoảng 25%, và đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 30% đến khoảng 35% các oligosacarit trong vùng Fc của ABM được cắt đôi lai không fucosyl hóa.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA (ví dụ ABM biến dị) được biến đổi di truyền để có chức năng tác động cao và/hoặc ái lực gắn kết thụ thể Fc cao, được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế. Chức năng tác động cao có thể bao gồm, nhưng không giới hạn

ở một hoặc nhiều chức năng tác động dưới đây: độc tính tế bào do Fc tạo ra tăng (bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể tăng), sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCP), tiết xuất xytokin tăng, hấp thụ kháng nguyên do phức hệ miễn dịch tạo ra tăng nhờ các tế bào thể hiện kháng nguyên, gắn kết với các tế bào NK tăng, gắn kết với các đại thực bào tăng, gắn kết với các bạch cầu đơn nhân to tăng, gắn kết với các tế bào nhiều dạng nhân tăng, truyền tín hiệu trực tiếp kích thích sự chết theo chương trình tăng, liên kết ngang của các kháng thể gắn kết đích tăng, quá trình trưởng thành tế bào dạng cây tăng, hoặc miễn cảm sơ bộ tế bào T tăng. Theo một phương án ưu tiên, ái lực gắn kết thụ thể Fc cao là gắn kết tăng với thụ thể hoạt hóa Fc, tốt nhất là FcγRIIIa. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là kháng thể, mảnh kháng thể chứa vùng Fc, hoặc protein dung hợp bao gồm vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch. Theo một phương án ưu tiên đặc biệt, phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị là kháng thể có ái lực hoàn thiện được làm giống như của người.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp để làm phát sinh và sử dụng hệ tế bào chủ để tạo ra các glycoform của các ABM theo sáng chế, có ái lực gắn kết thụ thể Fc cao, tốt hơn là gắn kết tăng với các thụ thể hoạt hóa Fc và/hoặc có các chức năng tác động cao, bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể. Phương pháp biến đổi di truyền bằng glycogen mà có thể được sử dụng với các ABM theo sáng chế được mô tả chi tiết hơn trong Patent Mỹ số 6602684, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/0241817 A1, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0175884 A1, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời số No. 60/441,307 và công bố đơn quốc tế WO 2004/065540, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo cách khác, các ABM theo sáng chế có thể được biến đổi di truyền bằng glycogen để có các gốc fucoza giảm ở vùng Fc theo các kỹ thuật bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0157108 (Genentech), hoặc trong EP 1176195 A1, công bố đơn quốc tế WO 03/084570, công bố đơn quốc tế WO 03/085119 và các công

bổ đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140 (Kyowa). Các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các ABM được biến đổi di truyền bằng glycogen theo sáng chế có thể được tạo ra trong các hệ biểu hiện mà tạo ra các glycoprotein cải biến, như các hệ được chỉ dẫn trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/344,169 và công bố đơn quốc tế WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) hoặc trong công bố đơn quốc tế WO 2004/057002 và công bố đơn quốc tế WO 2004/024927 (Greenovation).

Quá trình phát sinh các dòng tế bào để tạo ra các protein có dạng glycosyl hóa biến đổi

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các hệ biểu hiện tế bào chủ để tạo ra các ABM theo sáng chế có các dạng glycosyl hóa cải biến. Đặc biệt, sáng chế đề xuất các hệ tế bào chủ để tạo ra các các glycoform của các ABM theo sáng chế có giá trị chữa bệnh cải thiện. Vì vậy, sáng chế đề xuất các hệ biểu hiện tế bào chủ được chọn hoặc biến đổi di truyền để biểu hiện polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza. Theo một phương án đặc biệt, hoạt tính glycosyltransferaza là hoạt tính GnTIII. Theo một phương án, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit dung hợp bao gồm miền định vị Golgi của polypeptit ở trong Golgi khác loại. Đặc biệt, các hệ biểu hiện tế bào chủ này có thể được biến đổi di truyền để bao gồm phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa polypeptit có GnTIII, liên kết động với hệ gen khởi đầu cấu thành hoặc điều chỉnh.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất tế bào chủ được biến đổi di truyền để biểu hiện ít nhất một axit nucleic mã hóa polypeptit dung hợp có hoạt tính GnTIII và bao gồm miền định vị Golgi của polypeptit ở trong Golgi khác loại. Theo một khía cạnh, tế bào chủ được biến đổi di truyền bằng phân tử axit nucleic bao gồm ít nhất một gen mã hóa polypeptit dung hợp có hoạt tính GnTIII và bao gồm miền định vị Golgi của polypeptit ở trong Golgi khác loại.

Nói chung, loại bất kỳ của dòng tế bào nuôi cấy, bao gồm các dòng tế bào thảo luận ở trên, có thể được sử dụng như gốc để biến đổi di truyền các dòng tế bào chủ theo sáng chế. Theo một phương án ưu tiên, các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NS0, các tế bào Sp2/0, các tế bào u tủy YO, các tế bào u tủy chuột P3X63, các tế bào PER, các tế bào PER.C6 hoặc các tế bào lai, các tế bào động vật có vú khác, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào thực vật được sử dụng làm dòng tế bào gốc để tạo ra các tế bào chủ được biến đổi di truyền như được xác định ở đây.

Sáng chế được dự tính bao gồm tế bào chủ biến đổi di truyền bất kỳ biểu hiện polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza, ví dụ hoạt tính GnTIII, bao gồm polypeptit dung hợp mà bao gồm miền định vị Golgi của polypeptit ở trong Golgi khác loại như được xác định ở đây.

Một hoặc một vài axit nucleic mã hóa polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza, ví dụ hoạt tính GnTIII, có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cấu thành hoặc, lần lượt, hệ biểu hiện điều chỉnh. Hệ này là đã biết rõ trong trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm các hệ được thảo luận ở trên. Nếu một vài axit nucleic mã hóa polypeptit dung hợp có hoạt tính glycosyltransferaza, ví dụ hoạt tính GnTIII, và bao gồm miền định vị Golgi của polypeptit ở trong Golgi khác loại có trong hệ tế bào chủ, một vài loại trong số đó được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cấu thành, trong khi các loại khác được biểu hiện dưới sự kiểm soát gen khởi đầu điều chỉnh. Các mức biểu hiện của polypeptit dung hợp có hoạt tính glycosyltransferaza, ví dụ hoạt tính GnTIII, được xác định bằng các phương pháp thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm phân tích phép thấm tách Tây, phân tích phép thấm tách Bắc, phân tích biểu hiện gen báo cáo hoặc phép đo hoạt tính glycosyltransferaza, ví dụ hoạt tính GnTIII. Theo cách khác, lectin có thể được sử dụng mà nó gắn kết với các sản phẩm tổng hợp sinh học của GnTIII, ví dụ, E4-PHA lectin. Theo cách khác, thử nghiệm chức xác định gắn kết thụ thể Fc cao hoặc chức năng tác động cao gây ra

bởi các kháng thể được tạo ra bằng các tế bào biến đổi di truyền nhờ axit nucleic mã hóa polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza, ví dụ hoạt tính GnTIII, có thể được sử dụng.

Quá trình nhận dạng các chất chuyển nhiễm hoặc các chất biến nạp biểu hiện protein có dạng glycosyl hóa cải biến

Các tế bào chủ mà chứa trình tự mã hóa ABM biến dị kháng CEA (ví dụ ABM được làm giống như của người, ái lực hoàn thiện và/hoặc có độ ổn định hoàn thiện) và nó biểu hiện các sản phẩm gen hoạt tính sinh học có thể được nhận dạng bằng ít nhất bốn phương pháp chung: (a) lai ADN-ADN hoặc ADN-ARN; (b) có hoặc không có các chức năng gen “đánh dấu”; (c) đánh giá mức phiên mã như được xác định bởi sự biểu hiện của các sản phẩm phiên mã ARN thông tin tương ứng trong tế bào chủ; và (d) phát hiện sản phẩm gen như được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch hoặc bằng hoạt tính sinh học của nó.

Theo phương pháp thứ nhất, sự có mặt của trình tự mã hóa của biến dị kháng CEA và/hoặc trình tự mã hóa của polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza (ví dụ GnTIII) có thể được phát hiện bởi sự lai hóa ADN-ADN hoặc ADN-ARN nhờ sử dụng các mẫu lai thử bao gồm các trình tự nucleotit tương đồng lần lượt với các trình tự mã hóa tương ứng, hoặc các phần hoặc các dẫn xuất của chúng.

Theo phương pháp thứ hai, vật truyền biểu hiện tái tổ hợp/hệ chủ có thể được nhận dạng và chọn lọc dựa vào sự có mặt hoặc vắng mặt của chức năng gen “đánh dấu” nào đó (ví dụ hoạt tính thymidin kinaza, kháng lại các thuốc kháng sinh, kháng lại metotrexat, phenotyp biến nạp, hình thành thể hấp thụ trong baculovirut, v.v.). Ví dụ, nếu trình tự mã hóa của ABM theo sáng chế, hoặc một mảnh của chúng, và/hoặc trình tự mã hóa polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza (ví dụ GnTIII) được xen đoạn trong trình tự gen đánh dấu của vật truyền, thì các chất tái tổ hợp chứa các trình tự mã hóa tương ứng có thể được nhận dạng bởi sự vắng mặt của chức năng gen đánh dấu. Theo cách khác, gen đánh dấu có thể được đặt nối tiếp

với các trình tự mã hóa dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu giống nhau hoặc khác nhau được sử dụng để kiểm soát sự biểu hiện của các trình tự mã hóa. Quá trình biểu hiện gen đánh dấu đáp ứng với sự kích thích hoặc chọn lọc chứng tỏ sự biểu hiện của trình tự mã hóa của ABM theo sáng chế và/hoặc trình tự mã hóa của polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza (ví dụ GnTIII).

Theo phương pháp thứ ba, hoạt tính phiên mã đối với vùng mã hóa của ABM theo sáng chế, hoặc mảnh của chúng, và/hoặc trình tự mã hóa polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza (ví dụ GnTIII) có thể được đánh giá bằng các thử nghiệm lai. Ví dụ, ARN có thể được phân lập và phân tích bằng phép thấm tách Tây nhờ sử dụng mẫu lai thử tương đồng với các trình tự mã hóa của ABM theo sáng chế, hoặc mảnh của chúng, và/hoặc trình tự mã hóa của polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza (ví dụ GnTIII) hoặc các phần đặc biệt của chúng. Theo cách khác, toàn bộ axit nucleic của tế bào chủ có thể được chiết và thử nghiệm về sự lai hóa với các mẫu lai thử này.

Theo phương pháp thứ tư, biểu hiện của các sản phẩm protein có thể được đánh giá bằng miễn dịch, ví dụ bằng các phép thấm tách Tây, các thử nghiệm miễn dịch như miễn dịch phóng xạ-kết tủa, các thử nghiệm miễn dịch liên kết enzym và các thử nghiệm miễn dịch tương tự. Thử nghiệm cuối cùng về kết quả của hệ biểu hiện, tuy nhiên, bao gồm sự phát hiện các sản phẩm gen có hoạt tính sinh học.

Các ứng dụng chữa bệnh và các phương pháp sử dụng các phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp nhằm vào các tế bào in vivo hoặc in vitro biểu hiện CEA. Các tế bào mà biểu hiện CEA có thể được nhằm vào cho các mục đích chữa bệnh (ví dụ để điều trị rối loạn bằng cách nhằm vào các tế bào biểu hiện CEA để phá hủy bằng hệ miễn dịch). Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp nhằm vào các tế bào biểu hiện CEA ở đối tượng bao gồm cung cấp cho đối tượng chế phẩm chứa ABM theo sáng chế. Các tế bào mà biểu hiện

CEA cũng có thể được nhằm vào cho các mục đích chẩn đoán (ví dụ để xác định nếu chúng biểu hiện CEA, hoặc bình thường hoặc bất thường). Vì vậy, sáng chế còn đề cập đến các phương pháp để phát hiện sự có mặt của CEA hoặc tế bào biểu hiện CEA, hoặc in vivo hoặc in vitro. Một phương pháp để phát hiện sự biểu hiện CEA theo sáng chế bao gồm cho mẫu cần thử nghiệm, tùy ý với mẫu đối chứng, tiếp xúc với ABM theo sáng chế, trong các điều kiện cho phép tạo ra phức hệ giữa ABM và CEA. Sau đó quá trình phức hệ được phát hiện (ví dụ bằng ELISA hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này). Khi sử dụng mẫu đối chứng với mẫu thử nghiệm, khác biệt đáng kể bất kỳ theo thống kê về sự hình thành các phức chất ABM-CEA nếu so sánh các mẫu thử nghiệm và mẫu đối chứng biểu thị sự có mặt của CEA trong mẫu thử nghiệm.

Theo một khía cạnh, các ABM và/hoặc các ABM biến dị theo sáng chế có thể sử dụng các tế bào đích in vivo hoặc in vitro mà biểu hiện CEA. Các tế bào biểu hiện CEA có thể là đích cho các mục đích chẩn đoán hoặc chữa bệnh. Theo một khía cạnh, các ABM theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của CEA trong mẫu. CEA được biểu hiện bất thường (ví dụ biểu hiện quá mức) trong nhiều khối u ở người so với mô không phải u của cùng kiểu tế bào. Vì vậy, các ABM và/hoặc các ABM biến dị theo sáng chế đặc biệt được sử dụng để ngăn ngừa sự hình thành khối u, tiêu diệt các khối u và ức chế sự phát triển hoặc sự di căn của khối u. Các ABM và/hoặc các ABM biến dị theo sáng chế còn có tác dụng làm ngừng chu trình tế bào, gây chết theo chương trình các tế bào đích (ví dụ các tế bào u), và ức chế sự tạo mạch và/hoặc biệt hoá của các tế bào đích. Các ABM và/hoặc các ABM biến dị theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị khối u bất kỳ biểu hiện CEA. Các khối u ác tính đặc biệt có thể được điều trị bằng các ABM và/hoặc các ABM biến dị theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy và bệnh ung thư vú.

Các ABM và/hoặc các ABM biến dị kháng CEA đề cập ở đây có thể được sử dụng riêng rẽ để ức chế sự phát triển của khối u hoặc giết các tế bào u. Ví dụ, các ABM kháng CEA có thể gắn kết với CEA tức là trên màng hoặc bề mặt tế bào của các tế bào ung thư và tạo ra, ví dụ hiệu quả giết các tế bào ung thư nhờ ADCC hoặc tác động khác. Các ABM và/hoặc các ABM biến dị kháng CEA có thể được làm giống như của người, đặc biệt hoàn thiện ái lực và/hoặc hoàn thiện độ ổn định, đặc biệt hơn, được biến đổi di truyền bằng glycogen và hoàn thiện ái lực và độ ổn định.

Các ABM và/hoặc các ABM biến dị có thể được sử dụng riêng rẽ theo cách khác để phong bế hoạt tính của kháng nguyên CEA, đặc biệt bằng cách cản trở vật lý sự gắn kết của nó ở hợp chất khác. Ví dụ, các phân tử gắn kết kháng nguyên và các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị có thể được sử dụng để phong bế sự dính bám tế bào do CEA tạo ra.

Các ABM và/hoặc các ABM biến dị kháng CEA theo sáng chế được cung cấp cho động vật có vú, tốt hơn là người, dưới dạng liều được dùng như các dạng được thảo luận dưới đây, bao gồm các dạng có thể được sử dụng trong tĩnh mạch người như tiêm ngay lập tức một lượng thuốc lớn hoặc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian, tiêm trong cơ, trong màng bụng, trong não tuỷ, dưới da, trong khớp, trong hoạt dịch, trong nội tuỷ mạc, sử dụng qua đường miệng, hoặc xông. Các ABM còn thích hợp để sử dụng trong u, quanh u, trong tổn thương, để tạo ra các tác dụng chữa bệnh khu trú cũng như toàn thân. Cách sử dụng trong màng bụng được mong đợi là đặc biệt có ích, ví dụ để điều trị các khối u ruột kết trực tràng.

Để chữa bệnh, liều thích hợp của ABM và/hoặc ABM biến dị sẽ tùy thuộc vào loại bệnh cần điều trị, mức độ nghiêm trọng và chiều hướng của bệnh, liệu pháp trước đó, quá trình lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể, và việc

xem xét của thầy thuốc điều trị. ABM thích hợp để cung cấp cho bệnh nhân một lần hoặc trong toàn bộ quá trình điều trị.

Sáng chế đề xuất phương pháp để giết chọn lọc các tế bào u biểu hiện CEA. Phương pháp này bao gồm cho các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các thể tiếp hợp phản ứng (ví dụ độc tố miễn dịch) theo sáng chế tiếp xúc với các tế bào u này. Các tế bào u đó có thể từ caxinom ở người bao gồm caxinom ruột kết trực tràng, caxinom phổi tế bào không nhỏ (NSCLC), caxinom dạ dày, caxinom tuyến tụy và caxinom vú.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế sự dính bám tế bào của tế bào u do CEA gây ra. Phương pháp này bao gồm cho tế bào u này tiếp xúc với các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị theo sáng chế hoặc các thể tiếp hợp của sáng chế. Các tế bào u đó có thể từ các tế bào của người, bao gồm các tế bào ung thư ruột kết, các tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC), các tế bào ung thư dạ dày, các tế bào ung thư tuyến tụy và các tế bào ung thư vú.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị các caxinom (ví dụ, các caxinom ở người) *in vivo*. Phương pháp này bao gồm cung cấp cho đối tượng một lượng hữu hiệu trị liệu của chế phẩm chứa ít nhất một trong các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các thể tiếp miễn dịch (ví dụ độc tố miễn dịch) như được bộc lộ ở đây.

Theo khía cạnh thêm nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp để điều trị các bệnh ung thư đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức CEA, bao gồm nhưng không giới hạn ở các tế bào ung thư ruột kết, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), các tế bào ung thư dạ dày, các tế bào ung thư tụy và các tế bào ung thư vú, bằng cách cung cấp một lượng hữu hiệu trị liệu của các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị kháng CEA được thể hiện ở đây.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để kích thích sự thoái lui mô u ở đối tượng nhờ sử dụng các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị kháng CEA được thể hiện ở đây. Các ví dụ không hạn chế về mô u bao gồm u ruột kết trực tràng, u phổi tế bào không nhỏ, u dạ dày, u tuyến tụy và u vú. Theo một phương án đặc biệt, mô u là u ruột kết trực tràng.

Theo áp dụng của sáng chế này, đối tượng có thể là người, ngựa, lợn, bò, chuột, chó, mèo, và chim. Các động vật máu nóng khác cũng bao gồm trong sáng chế này.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp để ức chế sự phát triển của các tế bào u, điều trị khối u ở đối tượng, và điều trị bệnh dạng tăng sinh ở đối tượng. Các phương pháp đó bao gồm cung cấp cho đối tượng một lượng hữu hiệu của chế phẩm như được bộc lộ ở đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên biến dị kháng CEA được thể hiện ở đây để bào chế thuốc điều trị bệnh liên quan đến biểu hiện CEA bất thường. Theo một phương án đặc biệt, bệnh này là bệnh ung thư biểu hiện quá mức CEA, bao gồm nhưng không giới hạn ở u ruột kết trực tràng, u phổi tế bào không nhỏ, u dạ dày, u tuyến tụy và u vú. Theo một phương án đặc biệt, khối u là u ruột kết trực tràng.

Các thể tiếp hợp phân tử gắn kết kháng nguyên kháng CEA

Sáng chế cũng đề cập đến các thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm ABM hoặc ABM biến dị kháng CEA ở đây được kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân gây độc tế bào, như các tác nhân hóa liệu pháp hoặc thuốc, các tác nhân ức chế sự sinh trưởng, các độc tố (ví dụ các độc tố protein, các độc tố hoạt hóa enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật hoặc các mảnh của chúng), hoặc các chất đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch là thể tiếp hợp kháng thể-thuốc (ADC) trong đó kháng thể được kết hợp với một hoặc nhiều thuốc, bao gồm nhưng không giới hạn ở maytansinoid (xem các patent Mỹ số 5,208,020, 5,416,064 và Patent châu Âu EP 0425235B1); auristatin như các gốc thuốc monomethylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem các patent Mỹ số 5,635,483 và 5,780,588, và 7,498,298); dolastatin; calicheamicin hoặc dẫn xuất của chúng (xem các patent Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296; Hinman và các đồng tác giả, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); và Lode và các đồng tác giả, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); antraxycilin như daunomycin hoặc doxorubicin (xem tài liệu Kratz và các đồng tác giả, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey và các đồng tác giả, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov và các đồng tác giả, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik và các đồng tác giả, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King và các đồng tác giả, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); và patent Mỹ số 6,630,579); metotrexat; vindesin; taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothexen; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch là bao gồm ABM hoặc ABM biến dị kháng CEA như được mô tả ở đây được kết hợp với độc tố hoạt hóa enzym hoặc mảnh của chúng, bao gồm nhưng không giới hạn ở chuỗi bạch hầu A, các mảnh hoạt hóa không liên kết của độc tố bạch hầu, chuỗi ngoại độc tố A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi ricin A, chuỗi abrin A, chuỗi modeccin A, alpha-sarcin, các Aleurites fordii protein, các dianthin protein, các Phytolacca americana protein (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crotin, chất ức chế saponaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomyxin, enomyxin, và các tricothexen.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch là bao gồm ABM hoặc ABM biến dị kháng CEA như được mô tả ở đây được kết hợp với nguyên tử phóng

xạ để tạo ra thể tiếp hợp phóng xạ. Các chất đồng vị phóng xạ khác nhau có thể sử dụng để sản xuất các thể tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} và các chất đồng vị phóng xạ của Lu. Khi thể tiếp hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm một nguyên tử phóng xạ cho các nghiên cứu đồ thị nhấp nháy, ví dụ tc99m hoặc I^{123} , hoặc dấu spin cho sự tạo ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (cũng được biết là tạo ảnh cộng hưởng từ mri), như iodin-123 lần nữa, iodin-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Các thể tiếp hợp của kháng thể và tác nhân gây độc tế bào có thể được tạo ra nhờ sử dụng các tác nhân kết hợp protein hai chức như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt hóa (như disuccinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), các dẫn xuất bis-diazonium (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo hoạt hóa bis (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch ricin có thể được điều chế như được mô tả trong tài liệu Vitetta và các đồng tác giả, *Science* 238:1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminepentaaxetic đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat ví dụ để kết hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem công bố đơn quốc tế WO94/11026. Liên kết có thể là sự giải phóng làm dễ dàng cho “liên kết có thể phân giải” của thuốc gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, liên kết không ổn định axit, liên kết nhạy peptidaza, liên kết nhạy quang, liên kết dimetyl hoặc liên kết chứa disulfua (Chari và các đồng tác giả, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patent Mỹ số 5,208,020) có thể được sử dụng.

Các thể tiếp hợp miễn dịch hoặc các ADC dự tính ở đây, nhưng không giới hạn ở các thể tiếp hợp như vậy được điều chế bằng các chất phản ứng liên kết ngang bao gồm, nhưng không giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-

SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) mà có bán trên thị trường (ví dụ của Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Các dược phẩm, chế phẩm, các liều lượng, và các cách sử dụng

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm các ABM hoặc các ABM biến dị kháng CEA theo sáng chế và chất mang dược dụng. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng dược phẩm này trong phương pháp chữa bệnh, như bệnh ung thư, hoặc để bào chế thuốc chữa bệnh, như bệnh ung thư. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến phương pháp chữa bệnh, và đặc biệt hơn là để điều trị bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm cung cấp một lượng hữu hiệu trị liệu của dược phẩm theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm dược phẩm, các tổ hợp và các phương pháp để điều trị các caxinom ở người, ví dụ caxinom ruột kết trực tràng. Ví dụ, sáng chế bao gồm dược phẩm được sử dụng để điều trị các caxinom ở người, bao gồm một lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Các dược phẩm chứa ABM theo sáng chế có thể được cung cấp nhờ các cách sử dụng thông thường, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong miệng, trong hệ bạch huyết hoặc sử dụng trực tiếp ở khối u. Ưu tiên là sử dụng trong tĩnh mạch.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm dược chứa các ABM theo sáng chế được bào chế để lưu trữ bằng cách trộn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với các chất mang dược dụng tùy ý, các tá dược, hoặc các chất làm ổn định (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), dưới dạng các chế phẩm làm đông khô nhanh hoặc các dung dịch nước. Các chất mang,

các tá dược, hoặc các chất làm ổn định là không độc đối với người nhận với các liều lượng và các nồng độ sử dụng.

Chế phẩm được sử dụng để cung cấp in vivo phải là tiệt trùng. Điều này dễ dàng được thực hiện bằng cách lọc qua các màng lọc vô khuẩn.

Các sử dụng và chế độ liều hữu hiệu nhất đối với dược phẩm theo sáng chế phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng và tiến trình của bệnh, sức khỏe bệnh nhân và đáp ứng với điều trị và quyết định của bác sỹ điều trị. Vì vậy, các liều lượng chế phẩm sẽ cần được chuẩn độ cho từng bệnh nhân riêng biệt. Tuy nhiên, liều chế phẩm hữu hiệu theo sáng chế này sẽ thường nằm trong khoảng từ 0,01 đến 2000 mg/kg.

Các phân tử được mô tả ở đây có thể có các dạng liều lượng khác nhau, chúng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dung dịch lỏng hoặc huyền phù, viên nén, viên tròn, bột, viên thuốc đạn, viên vi nang polymer hoặc các vi nang, các liposome, và các dung dịch có thể tiêm hoặc truyền. Dạng ưu tiên phụ thuộc vào cách sử dụng và ứng dụng điều trị.

Chế phẩm bao gồm ABM theo sáng chế sẽ được bào chế, định liều và cung cấp theo kiểu phù hợp với quy trình sử dụng thuốc tốt. Các yếu tố được xem xét trong phạm vi sáng chế này bao gồm bệnh hoặc rối loạn đặc biệt được điều trị, động vật có vú đặc biệt được điều trị, trạng thái lâm sàng của bệnh nhân cụ thể, nguyên nhân gây bệnh hoặc rối loạn, vị trí sử dụng thuốc, phương pháp sử dụng, chương trình sử dụng, và các nhân tố khác đã biết đối với bác sỹ. Liều điều trị hữu hiệu của chất đối kháng được sử dụng sẽ được điều chỉnh bằng các xem xét như thế.

Các vật dụng sản xuất

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, vật dụng sản xuất chứa các vật liệu được sử dụng để điều trị, phòng ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả ở trên được đề xuất. Vật dụng sản xuất bao gồm thùng chứa và nhãn hiệu hoặc tài

liệu chỉ dẫn trên hoặc gắn với thùng chứa. Các thùng chứa thích hợp bao gồm các chai, các lọ nhỏ, các ống tiêm, các túi dung dịch IV, v.v.. Các thùng chứa có thể được tạo bởi các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Thùng chứa giữ chính chế phẩm hoặc chế phẩm kết hợp với chế phẩm khác có tác dụng điều trị, phòng ngừa và/hoặc chẩn đoán rối loạn và có thể có lỗ nạp vô khuẩn (ví dụ thùng chứa có thể là túi dung dịch truyền tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nắp bịt có thể chọc thủng bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hiệu hoặc tài liệu chỉ dẫn biểu thị rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị bệnh lựa chọn. Ngoài ra, vật dụng sản xuất có thể bao gồm (a) thùng chứa thứ nhất với chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế; và (b) thùng chứa thứ hai với chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm bao gồm tác nhân gây độc tế bào hoặc chữa bệnh khác. Vật dụng sản xuất theo phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm tài liệu chỉ dẫn biểu thị rằng các chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị bệnh đặc biệt. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật dụng sản xuất có thể còn bao gồm thùng chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm chất đệm được dụng, như nước kim vi khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các vật liệu khác mong muốn có bán trên thị trường và theo quan điểm sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm khác, các chất pha loãng, bộ lọc, kim, và bơm tiêm.

Cần phải hiểu rằng các sản phẩm bào chế nêu trên có thể bao gồm thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc ngoài ABM kháng CEA.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trừ khi được chỉ định khác, các tham khảo tới cách đánh số các vị trí gốc axit amin đặc hiệu trong các ví dụ dưới đây là theo hệ đánh số Kabat.

Ví dụ 1

Quá trình hình thành các thư viện trưởng thành ái lực

Thư viện H1/H2

Để tạo ra thư viện trưởng thành ái lực ngẫu nhiên trong vùng HCDR1 và HCDR2, các bộ ba mã hoá các vị trí F32 G33 trong CDR1 và các vị trí W50 N52 T52a K52b T54 E56 T58 trong CDR2 được ngẫu nhiên hoá. Ở bước thứ nhất, mảnh ADN (mảnh 1) được khuếch đại nhờ sử dụng pMS22 làm khuôn mẫu và các đoạn mồi MS-43 (SEQ ID NO: 123) và EAB-679 (SEQ ID NO: 127) chứa các vị trí CDR1 được ngẫu nhiên hoá (Fig.11). Nhờ sử dụng cùng khuôn mẫu, các đoạn mồi MS-56 (SEQ ID NO: 126) và MS-52 (SEQ ID NO: 124) khuếch đại mảnh thứ hai (mảnh 2) mà có vùng bao trùm ở đầu 3' của mảnh 1. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 25 chu trình, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tái 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 20 giây và 50 giây ở 72°C cho mảnh 1 và mảnh 2 tương ứng. Bước ủ cuối cùng 10 phút ở 72°C được tiến hành vào lúc kết thúc. Cả hai mảnh được tinh chế trên gel agarosa. Quá trình mở rộng bao trùm PCR với mảnh 1 và 2 nhờ sử dụng các đoạn mồi MS-43 (SEQ ID NO: 123) và EAB-680 (SEQ ID NO: 128), nó che giấu các vị trí ngẫu nhiên của CDR2, tạo ra mảnh với cả hai CDR ngẫu nhiên hoá (mảnh 3). Đối với tập hợp của các mảnh 1 và 2, các lượng đẳng mol của mảnh 1 và mảnh 2 được sử dụng. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 5 chu trình không có các đoạn mồi, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tái 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 40 giây ở 72°C. Sau khi bổ sung các đoạn mồi vòng ngoài, 20 chu trình khác được tiến hành nhờ sử dụng các thông số tương tự. Mảnh thứ tư (mảnh 4) bao trùm ở vùng 3' của mảnh 3 được khuếch đại bằng PCR nhờ sử dụng lại pMS22 làm khuôn mẫu và các đoạn mồi MS-55 (SEQ ID NO: 125) và MS-52 (SEQ ID NO: 124). Sau khi tinh chế bằng gel, quá trình mở rộng bao trùm PCR cuối cùng nhờ sử dụng mảnh 3 và 4 làm các khuôn mẫu và các đoạn mồi

MS-43 và MS-52 tạo ra mảnh chứa CL và các phần của VH. Đối với quá trình này, các lượng đẳng mol của mảnh 3 và mảnh 4 được sử dụng. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 5 chu trình không có các đoạn môi, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tời 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 80 giây ở 72°C. Sau khi bổ sung các đoạn môi vòng ngoài, 20 chu trình khác được tiến hành nhờ sử dụng các thông số tương tự. Sau đó mảnh thu được được tinh chế bằng gel và ghép buộc với pMS22 sau khi cắt bằng NcoI/NheI.

Thư viện L1/L2

Để tạo ra thư viện trưởng thành ái lực ngẫu nhiên trong vùng LCDR1 và LCDR2, các bộ ba mã hoá các vị trí Q27, N28, V29, G30 T31 N32 trong CDR1 và các vị trí Y49 S50 Y53 R54 Y55 S56 trong CDR2 được ngẫu nhiên hoá. Ở bước thứ nhất, mảnh ADN (mảnh 1) được khuếch đại nhờ sử dụng pMS22 làm khuôn mẫu và các đoạn môi EAB-685 (SEQ ID NO: 129) và EAB-681 (SEQ ID NO: 133) mà chứa các vị trí CDR1 được ngẫu nhiên hoá (Fig.12). Nhờ sử dụng cùng khuôn mẫu, các đoạn môi EAB-686 (SEQ ID NO: 130) và EAB-687 (SEQ ID NO: 131) khuếch đại mảnh thứ hai (mảnh 2) mà có vùng bao trùm ở đầu 3' của mảnh 1. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 25 chu trình, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tời 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 60 giây ở 72°C cho mảnh 1 và mảnh 2 tương ứng. Bước ủ cuối cùng 10 phút ở 72°C được tiến hành vào lúc kết thúc. Cả hai mảnh được tinh chế trên gel agarosa. Quá trình mở rộng bao trùm PCR với mảnh 1 và 2 nhờ sử dụng các đoạn môi EAB-685 (SEQ ID NO: 129) và EAB-682 (SEQ ID NO: 134), nó che giấu các vị trí ngẫu nhiên của CDR2, tạo ra mảnh với cả hai CDR ngẫu nhiên hoá (mảnh 3). Đối với tập hợp của các mảnh 1 và 2, các lượng đẳng mol của mảnh 1 và mảnh 2 được sử dụng. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 5 chu trình không có các đoạn môi, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tời 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 60 giây ở 72°C. Sau khi bổ sung các đoạn môi vòng ngoài, 20 chu trình khác được tiến hành nhờ sử dụng các

thông số tương tự. Mảnh thứ tư (mảnh 4) bao trùm ở đầu 3' của mảnh 3 được khuếch đại bằng PCR nhờ sử dụng lại pMS22 làm khuôn mẫu và các đoạn môi EAB-688 (SEQ ID NO: 132) và EAB-687 (SEQ ID NO: 131). Sau khi tinh chế bằng gel, quá trình mở rộng bao trùm PCR cuối cùng nhờ sử dụng mảnh 3 và 4 làm các khuôn mẫu và các đoạn môi EAB-685 (SEQ ID NO: 129) và EAB-687 (SEQ ID NO: 131) tạo ra mảnh chứa VL và các phần của CL. Đối với quá trình này, các lượng đẳng mol của mảnh 3 và mảnh 4 được sử dụng. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 5 chu trình không có các đoạn môi, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tời 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 80 giây ở 72°C. Sau khi bổ sung các đoạn môi vòng ngoài, 20 chu trình khác được tiến hành nhờ sử dụng các thông số tương tự. Sau đó mảnh này được ghép buộc với pMS22 sau khi cắt bằng HindIII/SacI.

Các thư viện H3

Để tạo ra các thư viện trưởng thành ái lực ngẫu nhiên trong vùng HCDR3, các bộ ba mã hoá các vị trí W95, D96, F97, Y98, D99, Y100, V100a, E100b, A100c, và M100d được ngẫu nhiên hoá theo hai phương pháp khác nhau: (1) ngẫu nhiên hoá đoạn nguyên vẹn (thư viện H3 đầy đủ) hoặc (2) ngẫu nhiên hoá riêng biệt mỗi vị trí tạo ra mười thư viện phụ. Các thư viện phụ chứa các dòng vô tính với các vị trí ngẫu nhiên riêng biệt được tập hợp sau khi biến nạp thành vi khuẩn (thư viện tập hợp H3). Để ngẫu nhiên hoá vùng HCDR3, các mảnh được khuếch đại bằng PCR nhờ sử dụng đoạn môi được tời trong đầu 3' của CL và các đoạn môi mà che giấu các trình tự ngẫu nhiên của HCDR3 (Fig.13). Sau đó quá trình mở rộng bao trùm PCR được tiến hành với mảnh thứ hai bao trùm ở đầu 3' của mảnh 1, và bao gồm đầu tận cùng VH và vùng 5' của CH1. Sau đó các mảnh tập hợp được ghép buộc vào pMS22 sau khi cắt bằng *SacI/NheI*. Để tạo ra thư viện tập hợp H3, mười mảnh ADN được khuếch đại bằng PCR riêng biệt nhờ sử dụng từng đoạn môi trong số các đoạn môi AC7-AC16 (SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 144) kết hợp với đoạn môi EAB-749 (SEQ ID NO: 146). Để tạo ra thư viện L3 đầy đủ, các đoạn môi

AC17 (SEQ ID NO: 145) và EAB-749 (SEQ ID NO: 146) được sử dụng. pMS22 plasmit được sử dụng làm khuôn mẫu. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 25 chu trình, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tái 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 36 giây ở 72°C, tiếp theo là bước ủ cuối cùng 10 phút ở 72°C. Các quá trình này tạo ra các mảnh dài khoảng 580 bp, các mảnh này được tinh chế bằng gel agarosa. Đối với quá trình mở rộng bao trùm PCR, mảnh thứ hai được khuếch đại nhờ sử dụng hoặc đoạn mồi EAB-750 (SEQ ID NO: 147) hoặc EAB-751 (SEQ ID NO: 148) kết hợp với EAB-752 (SEQ ID NO: 149). Trong khi đoạn mồi EAB-750 (SEQ ID NO: 147) có trình tự bao trùm ở các đoạn mồi ngẫu nhiên AC7-11 (SEQ ID NO: 139), EAB-751 (SEQ ID NO: 148) có chung các tính tương đồng trình tự với các đoạn mồi ngẫu nhiên AC12-17 (SEQ ID NOs: 140-145). Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 25 chu trình, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tái 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 12 giây ở 72°C, tiếp theo là bước ủ cuối cùng 10 phút ở 72°C. Các mảnh thu được dài khoảng 180bp. Đối với tập hợp cả hai mảnh, các lượng đẳng mol của mảnh 1 và mảnh 2 tương ứng được sử dụng. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 5 chu trình không có các đoạn mồi, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tái 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 60 giây ở 72°C. Sau khi bổ sung các đoạn mồi vòng ngoài EAB-749 (SEQ ID NO: 146) và EAB-752 (SEQ ID NO: 149), 20 chu trình khác được tiến hành nhờ sử dụng các thông số tương tự. Kết thúc, bước ủ 10 phút ở 72°C được tiến hành. Sau đó các mảnh được tinh chế bằng gel được ghép buộc với pMS22 sau khi cắt bằng *SacI/NheI* và các đoạn thất buộc tinh chế được biến nạp thành vi khuẩn TG1 bằng cách xung điện.

Các thư viện L3

Để tạo ra các thư viện trưởng thành ái lực ngẫu nhiên trong vùng CDR3 của chuỗi nhẹ, các bộ ba mã hoá các vị trí Y91, Y92, T93, Y94, và L95a hoặc được ngẫu nhiên hóa trong toàn bộ đoạn (thư viện L3 đầy đủ) hoặc tạo thành năm thư

viện phụ. Các thư viện phụ chứa các dòng vô tính với các vị trí ngẫu nhiên riêng biệt được tập hợp sau khi biến nạp thành vi khuẩn (thư viện tập hợp L3). Để tạo ra năm thư viện phụ, năm mảnh ADN được khuếch đại bằng PCR nhờ sử dụng từng đoạn mỗi trong số các đoạn mỗi AC1-AC5 (SEQ ID NOs: 150-154) kết hợp với đoạn mỗi MS43 (SEQ ID NO: 123). Để tạo ra thư viện L3 đầy đủ, tổ hợp đoạn mỗi AC6 (SEQ ID NO: 155) và MS43 (SEQ ID NO: 123) được sử dụng (Fig.14). Plasmid pMS22 được sử dụng làm khuôn mẫu. Các điều kiện khuếch đại bao gồm bước ủ 5 phút ở 94°C ban đầu, tiếp theo là 25 chu trình, mỗi chu trình gồm bước làm biến tính 1 phút ở 94°C, tái 1 phút ở 55°C, và bước kéo dài 25 giây ở 72°C, tiếp theo là bước ủ cuối cùng 10 phút ở 72°C. Các mảnh thu được bao gồm các vị trí 1-104 của miền VL được tinh chế bằng gel agarosa và sử dụng làm khuôn mẫu cho quá trình khuếch đại PCR bổ sung. Tất cả các phản ứng được tiến hành có đoạn mỗi EAB-746 (SEQ ID NO: 156) mà có trình tự bao trùm ở các đoạn mỗi ngẫu nhiên và MS43 (SEQ ID NO: 123) nhờ sử dụng các điều kiện tương tự được mô tả ở trên. Các mảnh đã tinh chế cũng như pMS22 được cắt bằng NcoI/XhoI. Đối với tất cả năm thư viện phụ, 0,5µg xen đoạn được ghép buộc với 0,5µg pAC16. Đối với thư viện L3 đầy đủ, việc ghép buộc được tiến hành với 9,8µg xen đoạn và 9,8µg pMS22. Các đoạn thất bại được tinh chế được biến nạp thành vi khuẩn TG1 bằng cách xung điện.

Quá trình tạo ra các kháng nguyên

Do cả hai kháng thể chuột và được làm giống như của người PR1A3 nhận dạng chỉ màng gắn kết chứ không nhận dạng CEA tan chảy của người, protein thể khảm tái tổ hợp mà chứa epitop của PR1A3 được tạo ra cho quá trình trưởng thành ái lực in vitro của PR1A3 được làm giống như của người (SEQ ID NO:7 và 8). Quá trình làm phát sinh protein lai này được tiến hành như được mô tả trong tài liệu Steward và các đồng tác giả, 1999. Một cách vắn tắt, trình tự ADN của miền B của glycoprotein mật người (BGP) được thay thế bằng trình tự của miền CEA- B3 người, trình tự này chứa epitop của PR1A3. Do vậy, trình tự mã hóa protein lai mà

bao gồm các miền N và A1 của BGP, miền B3 của CEA và miền A2 của BGP (N-A1-B3-A2, huNABA). Sau đó sản phẩm dung hợp này hoặc được liên kết với phần Fc của IgG1 người (huNABA-Fc) (Steward và các đồng tác giả, *Cancer Immunol Immunother*, 47:299-306, 1999) hoặc dung hợp với trình tự mã hóa điểm phân cắt proteaza chính xác, avi tag và (His)6 tag (huNABA-avi-his) (SEQ ID NO:158). huNABA-Fc được tinh chế từ dịch nổi của dòng tế bào CHO chuyển nhiễm ổn định nhờ sử dụng cột protein A. huNABA-avi-his được chuyển nhiễm tạm thời vào các tế bào HEK 293, biểu hiện ổn định protein EBNA thu được từ EBV. Plasmid đồng chuyển nhiễm đồng thời mã hóa biotin ligaza cho phép quá trình biotin hóa đặc hiệu in vivo avi tag. Sau đó protein được tinh chế bằng phép sắc ký ái lực kim loại làm bất động động (IMAC) tiếp theo là lọc gel.

Quá trình trưởng thành ái lực của PR1A3 được làm giống như của người

Quá trình tạo ra các Fab PR1A3 được làm giống như của người có ái lực hoàn thiện được tiến hành bằng cách thể hiện thể thực khuẩn nhờ sử dụng các phương pháp chuẩn (Silacci và các đồng tác giả, *Proteomics*, 5(9):2340-2350, 2005). Quá trình chọn lọc với tất cả các thư viện trưởng thành ái lực được tiến hành trong dung dịch theo quy trình dưới đây: 1. gắn kết ~ 10¹² các hạt phagemit của mỗi thư viện trưởng thành ái lực với 100nM huNABA-avi-his biotin hóa trong 0,5 giờ với thể tích tổng là 1ml, 2. giữ huNABA-avi-his biotin hóa và các thể thực bào nhỏ gắn kết đặc hiệu bằng cách bổ sung $5,4 \times 10^7$ hạt từ tính được bao streptavidin trong 10 phút, 3. rửa các hạt bằng 5-10x 1ml PBS/Tween20 và 5-10x 1ml PBS, 4. rửa giải các thể thực bào nhỏ bằng cách bổ sung 1ml 100mM TEA (triethylamin) trong 10 phút và làm trung hòa bằng cách bổ sung 500ul 1M Tris/HCl pH 7,4 và 5. làm lây nhiễm lại vi khuẩn *E. coli* TG1 sinh trưởng theo cấp số nhân, lây nhiễm với thể thực khuẩn giúp VCSM13 và quá trình kết tủa PEG/NaCl tiếp theo các hạt phagemit được sử dụng trong các chu kỳ chọn lọc tiếp theo. Các quá trình chọn lọc được tiến hành trong 3-5 chu trình nhờ sử dụng các nồng độ kháng nguyên ổn định hoặc giảm đi (từ 10⁻⁷M đến 2x10⁻⁹M). Ở chu trình 2, việc giữ kháng nguyên: các

phức chất thể thực khuẩn được tiến hành nhờ sử dụng các đĩa neutravidin thay cho các hạt streptavidin. Các chất kết dính đặc hiệu được nhận dạng nhờ ELISA như sau: 100 μ l gồm 10 nM huNABA-avi-his biotin hóa trên mỗi giếng được phủ lên các đĩa neutravidin. Các dịch nổi vi khuẩn chứa Fab được thêm vào và các Fab gắn kết được phát hiện qua các dấu Flag của chúng nhờ sử dụng kháng thể thứ cấp kháng Flag/HRP. Các dòng vô tính dương tính với ELISA được biểu hiện nhờ vi khuẩn như các mảnh Fab tan được trong định dạng 96 giếng và các dịch nổi được chuyển tới thử nghiệm sàng lọc động học bằng phân tích SPR nhờ sử dụng BIACORE T100. Các dòng vô tính biểu hiện các Fab với các hằng số ái lực cao nhất được nhận dạng và các phagemit được tạo trình tự.

Quá trình tinh chế các Fab và phép đo các thông số động học

Để phân tích chính xác các thông số động học, các Fab được tinh chế từ các dịch nuôi cấy vi khuẩn. 500ml dịch nuôi cấy được cấy và kích thích bằng 1mM IPTG với OD₆₀₀ 0.9. Vi khuẩn được ủ ở 25°C qua đêm và thu hoạch bằng cách làm ly tâm. Sau khi ủ hạt tạo huyền phù lại trong 20 phút trong 25ml chất đệm PPB (30mM Tris-HCl độ pH là 8, 1mM EDTA, 20% sucroza), vi khuẩn được làm ly tâm lại và dịch nổi được thu hoạch. Bước ủ được lặp lại một lần bằng 25ml dung dịch 5mM MgSO₄. Các dịch nổi của cả hai bước ủ được tập hợp, lọc và nạp lên cột IMAC (His Gravitrap, GE Healthcare). Sau đó, cột được rửa bằng 40 thể tích. Sau khi giải hấp (500mM NaCl, 500mM imidazol, 20mM NaH₂PO₄, độ pH là 7,4) nước giải hấp được tạo đệm lại nhờ các cột PD10 (GE Healthcare). Sau đó các thông số động học của các Fab được nghiên cứu bằng phân tích SPR theo chuỗi pha loãng được sắp xếp từ 200nM đến 6,25nM.

Ví dụ 2

Kháng thể PR1A3 được khảm hoá để có vùng ổn định IgG1/kappa của người, và được biểu hiện nhờ sử dụng kỹ thuật GlycoMab để có mức độ đường không fucosyl hoá cao trong Fc. Các kháng thể được biến đổi di truyền bằng

glycogen và không được biến đổi di truyền bằng glycogen được so sánh ở tỷ lệ chất tác động so với đích là 25:1. Giá trị tối đa của việc giết tế bào đích phụ thuộc kháng thể được tăng gấp đôi bằng kỹ thuật biến đổi di truyền bằng glycogen vùng Fc (FIG.2). Giá trị giết tế bào gia tăng hơn nữa đạt được bằng cách tăng tỷ lệ tác động so với đích (FIG.2).

PR1A3 được làm giống như của người nhờ sử dụng các khung đồng nhất với các trình tự dòng phôi người. Trình tự IMGT IGHV7-4-1*02 (Số lưu giữ X62110) là thể nhận đối với VH được làm giống như của người và IMGT_hVK_1_39 (Số lưu giữ X59315) là thể nhận đối với quá trình làm giống như của người VL. Kháng thể PR1A3 được làm giống như của người bao gồm cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nặng CH7A và cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nhẹ CL1A thể hiện gắn kết thoả đáng với các tế bào caxinom ruột kết của người như được xác định bằng cách đếm dòng tế bào (FIG.3).

Quá trình trưởng thành ái lực của PR1A3 bằng cách thể hiện thể thực khuẩn được tiến hành nhờ sử dụng phương pháp chuẩn như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 1, ở đây. Kháng thể PR1A3 gốc được làm giống như của người được sử dụng cho quá trình trưởng thành ái lực bao gồm cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nặng CH7A và cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nhẹ CL1A. Các bảng 3-6 dưới đây thể hiện các thư viện sử dụng cho quá trình trưởng thành ái lực. Đối với thư viện L1/L2, các vị trí Valin 29, Alanin50, hoặc Serin51 trong các CDR được giữ không thay đổi. Đối với thư viện H1/H2, các vị trí Isoleuxin51, Glyxin55, hoặc Alanin57 trong các CDR được giữ không thay đổi (các FIG.4 và FIG.5).

Cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nặng có ái lực hoàn thiện, CH7A rF9, và cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ái lực hoàn thiện CL1A rH11, được ghép đôi với cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nhẹ và cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nặng gốc tương ứng, và với nhau. Tất cả các kháng thể được chuyển hóa thành IgG1/kappa của người và gắn kết với dòng tế bào MKN45 dương tính với CEA được xác định bằng

cách đếm dòng tế bào. Các kháng thể bao gồm hoặc một trong các vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ có ái lực hoàn thiện hoặc cả hai vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ có ái lực hoàn thiện thể hiện các đặc tính gắn kết cải thiện như so với kháng thể gốc được làm giống như của người (FIG.6). Các FIG.6, FIG.10 và FIG.15 thể hiện một vài ví dụ trong đó các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoàn thiện độc lập góp phần làm tăng ái lực. Kháng thể gốc CH7A CL1A có cường độ tín hiệu thấp nhất, cũng như trị số EC50 cao nhất trong các FIG.6 và FIG.15. Chuỗi nhẹ hoàn thiện làm dịch chuyển các trị số EC50 tới các số thấp hơn, trong khi các chuỗi nặng hoàn thiện (rF9 trong FIG.6, và rB9 trong FIG.15) dịch chuyển cường độ tín hiệu huỳnh quang trong phép đo đếm dòng tế bào. FIG.10 thể hiện các đóng góp riêng biệt của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định bằng phương pháp Biacore. Tổ hợp của hai chuỗi đó còn làm gia tăng ái lực hơn nữa. Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.16, cải thiện ái lực dẫn đến cải thiện các đặc tính ADCC.

Các ái lực gắn kết của các CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có ái lực hoàn thiện được xác định bằng Biacore và được liệt kê trên Fig.34A và Fig.B.

Fig.35 tóm tắt các hằng số ái lực của các trình tự kháng thể có ái lực hoàn thiện khác nhau. Kháng thể gốc PR1A3 được liệt kê cũng như một vài tổ hợp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các trình tự hoàn thiện và không hoàn thiện. Tất cả các trị số thu được bằng công nghệ Biacore nhờ đo các hằng số tốc độ kết hợp và (k_{on}) và phân ly (k_{off}) của các cấu trúc kháng thể có thể hòa tan dưới định dạng Fab trên chip Biacore với chất phản ứng NABA-avi-his bất động (SEQ ID NO 158) làm kháng nguyên. Hằng số ái lực được đánh dấu bằng KD.

Ví dụ 3

Khung thụ thể sử dụng để tạo ra các kháng thể kháng CEA ái lực hoàn thiện được mô tả trong Ví dụ 2 là loại VH7 người. Để tăng độ ổn định, trình tự khung thụ thể ổn định hơn được sử dụng làm cơ sở để biến đổi di truyền ổn định kháng thể. Dựa vào tính tương đồng trình tự của kháng thể chuột PR1A3, và giả thiết rằng các

trình tự dẫn xuất từ VH1 sẽ có tính ổn định trong cao hơn VH7, hoặc các số chẵn của các quần hợp nhỏ VH người (Ewert, S., Huber, T., Honegger, A. và Plückthun, A. (2003) *J. Mol. Biol.*, 325, 531-553), trình tự IGHV-1-18; Acc No.:M99641 được sử dụng làm khung thụ thể mới. Ghép vòng CDR thông thường của kháng thể PR1A3 dẫn đến cấu trúc CH1A (SEQ ID NO: 279). Đáng tiếc, phân tử này không thể hiện hoạt tính gắn kết đáng kể đối với kháng nguyên CEA. Hoạt tính gắn kết của cấu trúc này được so sánh với hoạt tính gắn kết của các miền biến đổi dẫn xuất từ chuột chứa kháng thể thể khảm PR1A3 với các nồng độ khác nhau. Các tế bào BxPC3 được sử dụng để gắn kết đặc hiệu các kháng thể với CEA và cường độ gắn kết được xác định bằng các phân tích FACS. Fig.17.

Để khôi phục ái lực gắn kết, một vài đột biến ngược được đưa vào trình tự CH1A để tạo ra các chuỗi nặng mới CH1A1 (SEQ ID NO: 257), CH1A2 (SEQ ID NO:258), CH1A3 (SEQ ID NO: 259), và CH1A4 (SEQ ID NO: 260). CH1A1 bao gồm đột biến điểm kép M69F/T71L. Ba thể biến dị sau có các khung toàn vẹn 1, 2, hoặc 3 tương ứng, được thay thế bằng thể biến dị chuột. Fig.18 thể hiện gắn kết của các cấu trúc đó khi ghép đôi với chuỗi nhẹ 2F1 (SEQ ID NO: 209). Trong thử nghiệm này, gắn kết tế bào của các thể biến dị kháng thể gốc CH1A với các tế bào MKN-45 biểu hiện CEA được phân tích với các nồng độ khác nhau. Chuỗi nhẹ 2F1 ái lực trưởng thành giống hệt với tất cả các kháng thể thử nghiệm ngoại trừ kháng thể gốc mà ở đó chuỗi nhẹ gốc CL1A được sử dụng. Huỳnh quang trung bình được xác định bằng phân tích FACS. Fig.19 thể hiện các tính ổn định của các cấu trúc đo khi ghép đôi với chuỗi nhẹ 2F1, như được xác định bằng sự tán xạ ánh sáng động (DLS) của các mẫu. Phân tích DLS được tiến hành nhờ sử dụng 1 mg/ml các kháng thể trong dung dịch đệm gồm 20mM Histidin và 140mM NaCl ở độ pH 6,0. Thử nghiệm được tiến hành bắt đầu ở 25°C với sự gia tăng nhiệt độ dần là 0,05°C/phút lên tới 70°C. Tất cả các kháng thể thử nghiệm trong thử nghiệm này có 2F1 là chuỗi nhẹ.

Do CH1A1 vẫn giữ tính ổn định gốc, và cũng thể hiện gắn kết đáng kể hơn (nhưng CH1A4 một chút, mà có ái lực cao nhất, nhưng tính ổn định thấp nhất), cấu trúc này được chọn để tối ưu hóa hơn nữa gắn kết. Các chuỗi nặng mới CH1A1A (SEQ ID NO: 261), CH1A1B (SEQ ID NO: 262), CH1A1C (SEQ ID NO: 263), CH1A1D (SEQ ID NO: 264), CH1A1E (SEQ ID NO: 265), CH1A1F (SEQ ID NO: 266), và CH1A1G (SEQ ID NO: 267) được tạo ra. Chúng là các thể biến dị cơ bản của CH1A1 chỉ với các đột biến ngược mới ở vùng FR1 và FR3. Fig.20 và Fig.21 thể hiện rằng các ái lực của chúng có thể được so sánh toàn bộ, mặc dù vẫn kém một chút với cấu trúc CH7A được làm giống như của người gốc VH7. Fig.20 thể hiện các biểu đồ của các đáp ứng so với thời gian trong các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt Proteon (Biacore) thu được đối với gắn kết của các thể biến dị khung gốc CH1A1 với protein NABA dạng khảm chứa kháng nguyên CEA. NABA biotin hóa được làm bất động trên chip phủ Neutravidin và các kháng thể được sử dụng làm các chất phân tích với các nồng độ 100, 50, 25, 12,5, 6,25, và 0 nM. Tiền dòng vô tính 5L1A10 và kháng thể gốc CH7A được dùng để so sánh trực tiếp. Chuỗi nhẹ 2F1 giống hệt với tất cả các kháng thể được thử nghiệm. Fig.21 thể hiện cường độ gắn kết của bảy thể biến dị gốc CH1A1 mang các đột biến khung bổ sung. Các kháng thể được ủ với các tế bào MKN45 biểu hiện CEA với các chuỗi nồng độ và cường độ gắn kết được xác định bằng phân tích FACS. Tiền dòng vô tính 5L1A10 và kháng thể gốc CH7A được dùng để so sánh trực tiếp. Tất cả các kháng thể thử nghiệm trong thử nghiệm này có 2F1 là chuỗi nhẹ. Các thể biến dị CH1A1A và CH1A1B được chọn là các thể biến dị cuối cùng của quá trình làm giống như của người gốc VH1 dựa vào các hiệu suất tinh chế tương đối tốt hơn và tập tính đơn phân của chúng.

Ví dụ 4

Các gốc của CDR-H3 mà được chọn lọc trong quy trình hoàn thiện ái lực được đưa riêng lẻ vào trình tự PR1A3 để thử nghiệm về tính ổn định kháng thể tăng. Fig.36.

Fig.22 thể hiện các phép đo cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) của ái lực (như được xác định dưới dạng lưỡng trị) của mỗi kháng thể đối với kháng nguyên CEA (chất phản ứng NABA như được mô tả bởi Stewart và các đồng tác giả Cancer Immunol Immunother (1999) 47:299-306). Thể hiện trên Fig.22 là các biểu đồ của các đáp ứng so với thời gian trong các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt Proteon (Biacore) thu được đối với gắn kết của các thể biến dị kháng thể CDR-H3 với protein NABA dạng khả chứa kháng nguyên CEA. NABA biotin hóa được làm bất động trên chip phủ Neutravidin và các kháng thể được sử dụng làm các chất phân tích với các nồng độ 100, 50, 25, 12,5, 6,25, và 0nM. Tiền dòng vô tính 5L1A10 và kháng thể gốc CH7A được dùng để so sánh trực tiếp. Tất cả các kháng thể thử nghiệm trong thử nghiệm này có 2F1 là chuỗi nhẹ. CH7A biến dị (W95Y) không thể hiện hoạt tính có thể xác định trong thử nghiệm này, tất cả các thể biến dị khác đều thể hiện hệ số ái lực với đích trong khoảng mười. Ái lực tương đối của mỗi loại, được xác định dưới dạng lưỡng trị, là như sau: 5HFF12 > CH7A (Y98A/D99Y) > CH7A (Y98A) > CH7A > CH7A (E102Q) > CH7A (D99Y) > CH7A (D99H) > CH7A (A103T) > CH7A (V101F) > CH7A (W95Y).

Phân tích DLS được tiến hành đối với các kháng thể như so với tiền 5HFF12 và chuỗi nặng CH7A chứa kháng thể gốc. Chuỗi nhẹ 2F1 giống với các kháng thể được thử nghiệm trong thử nghiệm này. Các Fig.23 và Fig. 24. Các kết quả của phân tích này đưa ra xếp loại dưới đây về các độ ổn định: CH7A (D99Y) > CH7A (Y98A/D99Y) > CH7A (V101F) > CH7A (D99H) > CH7A (A103T) > CH7A (W95Y) > CH7Ax2F1 (= PR1A3) > 5HFF12. Thử nghiệm DLS được tiến hành nhờ sử dụng 1mg/ml các kháng thể trong dung dịch đệm gồm 20mM Histidin và 140mM NaCl ở độ pH 6,0. Thử nghiệm được tiến hành bắt đầu ở 25°C với sự gia tăng nhiệt độ dần là 0,05°C/phút lên tới 70°C.

Thể đột biến kép (Y98A/D99Y) (SEQ ID NO: 223) được chọn để biến đổi di truyền ổn định hơn nữa khi nó thể hiện tính ổn định trong khi đó duy trì được ái lực cao cho CEA đích.

Ví dụ 5

Thể đột biến kép (Y98A/D99Y) của dẫn xuất PR1A3 được làm giống như của người CH7A được đưa vào các thể biến dị cuối cùng của quá trình làm giống như của người gốc VH1 – các cấu trúc CH1A1A, và CH1A1B.

Các biểu đồ của các đáp ứng so với thời gian trong các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt Proteon (Biacore) thu được đối với gắn kết của khung kết hợp và các thể biến dị CDR-H3 với protein NABA dạng khả năng chứa kháng nguyên CEA. NABA biotin hóa được làm bất động trên chip phủ Neutravidin và các kháng thể được sử dụng làm các chất phân tích với các nồng độ 100, 50, 25, 12,5, 6,25, và 0nM. Dòng vô tính tiền 5L1A10 và kháng thể gốc CH7A được dùng để so sánh trực tiếp. Tất cả các kháng thể thử nghiệm trong thử nghiệm này có 2F1 là chuỗi nhẹ. Fig.25.

Ví dụ 6

Các cấu trúc CH1A1A và CH1A1B thể hiện hoạt tính ADCC. ADCC được tạo ra bởi các thể biến dị CH1A1A và CH1A1B, thể biến dị trước của chúng CH1A1, và thể biến dị gốc CH7A được xác định sau 4 giờ bằng cách giải phóng lactat dehydrogenaza nhờ sử dụng các tế bào MKN45 làm các tế bào đích (T) và PBMC người là các tế bào hiệu ứng (E) với tỷ lệ E:T là 25:1. Việc giải phóng lactat dehydrogenaza là tương ứng với sự phân giải tế bào đích và thể hiện là phần trăm độc tính tế bào. Fig.26. Hoạt tính ADCC đối với các thể biến dị đó được khẳng định nhờ xác định bằng việc giải phóng calcein nhờ sử dụng các tế bào MKN45 là các tế bào đích (T) và PBMC người là các tế bào hiệu ứng (E) với tỷ lệ E:T là 25:1. Việc giải phóng calcein là tương ứng với sự phân giải tế bào đích và thể hiện là phần trăm độc tính tế bào với giá trị trung bình $\pm$ các trị số lệch chuẩn. Fig.27.

Hoạt tính ADCC cũng được quan sát đối với các cấu trúc CH1A1A và CH1A1B chứa CDRH3 ái lực hoàn thiện với đột biến kép Y98A/D99Y. ADCC được tạo ra bởi khung kết hợp và các thể biến dị CDR-H3 và CH7A chứa kháng thể gốc được xác định sau 24 giờ bằng cách giải phóng lactat dehydrogenaza nhờ sử

dụng các tế bào MKN45 (Fig.28) hoặc LS174T (Fig.29) là các tế bào đích và PBMC người là các tế bào hiệu ứng với tỷ lệ E:T là 5:1. Trong khi các tế bào MKN45 biểu hiện CEA với các mức cao, việc biểu hiện CEA là trung bình trong các tế bào LS174T. Việc giải phóng lactat dehydrogenaza là tương ứng với sự phân giải tế bào đích và thể hiện là phần trăm độc tính tế bào. Tất cả các kháng thể thử nghiệm trong các thử nghiệm ADCC có 2F1 là chuỗi nhẹ.

Fig.38 thể hiện các thứ tự trình tự axit amin của các vùng VH của các kháng thể kháng CEA hoàn thiện có ổn định khác nhau.

Ví dụ 7

Biến thể biến đổi di truyền bằng glycogen của kháng thể kháng CEA bao gồm chuỗi nặng CH1A1A (98/99) và chuỗi nhẹ 2F1 được thử nghiệm về tính hiệu lực ở kiểu ghép khác loài ung thư biểu mô ruột kết trực tràng ở chuột SCID biến đổi gen cho CD16 người. Các điều kiện thử nghiệm mẫu được nêu dưới đây. Các kết quả của thử nghiệm biểu thị rằng kháng thể kháng CEA này tạo ra lợi ích sống sót như so với đối chứng chất dẫn. Fig.30.

Các con vật: Ba mươi năm con chuột cái biến đổi gen CD16 Scid; 7-9 tuần tuổi vào lúc bắt đầu thử nghiệm (Charles River France) được duy trì trong điều kiện không có nguồn bệnh đặc hiệu với các chu trình hàng ngày gồm 12 giờ có ánh sáng/12 giờ trong bóng tối theo các nguyên tắc chỉ đạo được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi các nhà chức trách địa phương. Sau khi tới, các con vật được giữ trong một tuần để thích nghi với khí hậu và để theo dõi. Việc kiểm tra sức khỏe liên tục được tiến hành đều đặn.

Nuôi cấy tế bào và ứng dụng: các tế bào LS174T (các tế bào ung thư biểu mô ruột kết người; European Collection of Cell Culture) được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% FCS (PAA Laboratories, Austria). Các tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường bão hoà nước ở CO₂ 5%. Chu trình in vitro 24 được sử dụng để tiêm trong lách, với khả năng sống sót là 97%.

Tiêm tế bào khối u: Vào ngày tiêm, các tế bào u LS174T được thu gom nhờ sử dụng trypsin-EDTA (Gibco, Switzerland) từ các bình nuôi cấy (Greiner Bio-One) và chuyển vào 50ml môi trường nuôi cấy, rửa một lần và tạo huyền phù lại trong AIM V (Gibco, Switzerland). Một vết rạch nhỏ được tạo ra ở vùng bụng trái của chuột SCID/màu be được gây mê. Da và cơ được mở và ba mươi microlit (3×10^6 tế bào LS174T trong môi trường AimV) của huyền phù chứa tế bào được tiêm vào móm lách. Trước tiên cơ và sau đó da bụng được khâu bằng đường khâu có thể hấp thu được (Monosyn® 3-0, Braun).

Điều trị: tất cả các kháng thể kháng CEA và chất dẫn tương ứng được tiêm i.v. một lần mỗi tuần. Ba liều tất cả là 625ug kháng thể được tiêm trên một lần tiêm cho mỗi con chuột. Các dung dịch pha loãng kháng thể được điều chế mới từ nguyên liệu gốc trước khi sử dụng và bào chế trong

vào ngày thử nghiệm 0 với 1×10^6 A549 tế bào. Kháng thể bắt đầu được sử dụng vào ngày 7 và tiếp tục thêm 2 hoặc nhiều lần tiêm 20mM Histidin, 140mM NaCl, độ pH là 6,0 với nồng độ kháng thể 4,38mg/ml.

Ví dụ 8

Biến thể biến đổi di truyền bằng glycogen của kháng thể kháng CEA bao gồm chuỗi nặng CH1A1A (Y98A/D99Y) và chuỗi nhẹ 2F1 được thử nghiệm về tính hiệu lực ở kiểu ghép khác loài ung thư biểu mô phổi A549 ở chuột scid biến đổi gen cho CD16 người. Các điều kiện thử nghiệm mẫu được nêu dưới đây. Các kết quả của thử nghiệm biểu thị rằng kháng thể kháng CEA này tạo ra lợi ích sống sót phụ thuộc liều như so với đối chứng chất dẫn. Fig.31.

Các con vật: Ba mươi năm con chuột cái biến đổi gen CD16 Scid; 7-9 tuần tuổi vào lúc bắt đầu thử nghiệm (Charles River France) được duy trì trong điều kiện không có nguồn bệnh đặc hiệu với các chu trình hàng ngày gồm 12 giờ có ánh sáng/12 giờ trong bóng tối theo các nguyên tắc chỉ đạo được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi các nhà chức trách địa phương. Sau khi tới, các con vật được giữ trong

một tuần để thích nghi với khí hậu và để theo dõi. Việc kiểm tra sức khoẻ liên tục được tiến hành đều đặn.

Nuôi cấy tế bào và ứng dụng: các tế bào A549 (các tế bào NSCLC người; American Tissue Culture collection) được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% FCS (PAA Laboratories, Austria). Các tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường bão hòa nước ở CO₂ 5%.

Điều trị: Chuột được tiêm i.v. vào ngày thử nghiệm 0 với 1x10⁶ A549 tế bào. Kháng thể bắt đầu được sử dụng vào ngày 7 và tiếp tục thêm 2 hoặc nhiều lần tiêm mỗi tuần.

Chuột 35 chuột SCID -CD16Tg, N=7 trên một nhóm.

Các tế bào-các tế bào A549 5 Mio/chuột

Hợp chất và biểu điều trị

Chất dẫn 3q7d

CH1A1A(Y98A/D99Y) x 2F1 (500ug) 3q7d (25mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) x 2F1 (200ug) 3q7d (10mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) x 2F1 (100ug) 3q7d (5mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) x 2F1 (50ug) 3q7d (1mg/kg)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập gắn kết kháng nguyên ung thư phôi gắn kết màng (CEA), trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

chuỗi nặng CDR1 của SEQ ID NO:1,

chuỗi nặng CDR2 của SEQ ID NO: 13,

chuỗi nặng CDR3 của SEQ ID NO:223;

và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm:

chuỗi nhẹ CDR1 của SEQ ID NO:39,

chuỗi nhẹ CDR2 của SEQ ID NO:49, và

chuỗi nhẹ CDR3 của SEQ ID NO:56.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm các góc vùng khung của CH1A1A (SEQ ID NO: 261) hoặc CH1A1B (SEQ ID NO: 262).

3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này gắn kết với cùng epitop như, hoặc có khả năng cạnh tranh để gắn kết với, kháng thể đơn dòng chuột PR1A3.

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-3, trong đó kháng thể này gắn kết với CEA gắn kết màng với K_d là 100nM, 10nM, 1nM hoặc thấp hơn.

5. Kháng thể gắn kết với kháng nguyên ung thư phôi gắn kết màng (CEA), trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 239 và SEQ ID NO: 247 và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 209.

6. Kháng thể theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 239 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 209.
7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-6, trong đó kháng thể này bao gồm vùng Fc được biến đổi di truyền bằng glycogen.
8. Kháng thể theo điểm 7, trong đó ít nhất 20% đến 100% oligosacarit liên kết tại N ở vùng Fc không được fucosyl hóa.
9. Kháng thể theo điểm 7, trong đó ít nhất 20% đến 100% oligosacarit liên kết tại N ở vùng Fc được cắt đôi.
10. Kháng thể theo điểm 7, trong đó ít nhất 20% đến 50% oligosacarit liên kết tại N ở vùng Fc được cắt đôi, không được fucosyl hóa.
11. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7-10, trong đó kháng thể có ít nhất một chức năng tác động tăng.
12. Kháng thể theo điểm 11, trong đó ít nhất một chức năng tác động tăng được chọn từ nhóm bao gồm: ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng, độc tính tế bào trung gian kháng thể tăng (ADCC), gắn kết với các tế bào NK tăng, gắn kết với các đại thực bào tăng, gắn kết với các bạch cầu đơn nhân tăng, gắn kết với các bạch cầu hạt tăng, truyền tín hiệu trực tiếp kích thích sự chết theo chương trình tăng, quá trình trưởng thành tế bào tua tăng, và miễn cảm sơ bộ tế bào T tăng.
13. Kháng thể theo điểm 12, trong đó kháng thể có sự gia tăng ADCC từ ít nhất 40% đến 100% như so với kháng thể gốc không biến đổi di truyền bằng glycogen.
14. Polynucleotit phân lập mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-13.
15. Vật truyền bao gồm polynucleotit theo điểm 14.

16. Tế bào chủ bao gồm vật truyền theo điểm 15.
17. Chế phẩm bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-13 và chất mang được dùng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Roche Glycart AG

<120> Kháng thể phân lập gắn kết kháng nguyên ung thư phôi gắn kết màng và chế phẩm chứa kháng thể này

<130> 27344

<150> EP 11156665.9

<151> 2011-03-02

<160> 281

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1 Kabat

<400> 1

Glu Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1 Kabat

<400> 2

Glu Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1 Kabat

<400> 3

Glu Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (32)..(32)

<223> Xaa = Tyr hoặc Phe

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (33)..(33)

<223> Xaa = Ser hoặc Gly

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (35)..(35)

<223> Xaa = Asn hoặc ser

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (50)..(50)

<223> Xaa = Trp hoặc Tyr

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (55)..(55)

<223> Xaa = Thr, Ser, hoặc Asn

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (59)..(59)

<223> Xaa = Thr hoặc Asn

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (61)..(61)

<223> Xaa = Val hoặc Met

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (101)..(101)

<223> Xaa = Phe hoặc Ala

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (102)..(102)

<223> Xaa = Val, Phe, Ser, Tyr, hoặc Ala

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (103)..(103)

<223> Xaa = Asp, His, Trp, Glu hoặc Tyr

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (105)..(105)

<223> Xaa = Val, Phe, hoặc Leu

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (106)..(106)

<223> Xaa = Glu, Lys hoặc Gln

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (107)..(107)

<223> Xaa = Ala hoặc Thr

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC

<222> (108)..(108)

<223> Xaa = Met hoặc Leu

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Xaa

20 25 30

Xaa Met Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Xaa Ile Asn Thr Lys Xaa Gly Glu Ala Xaa Tyr Xaa Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala-Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1 Kabat

<400> 5

Glu Phe Gly Met Ser
 1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1 Chothia

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 1 5

<210> 7

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR1 Chothia

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 1 5

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR1 AbM

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe Gly Met Asn
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR1 AbM

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gly Met Asn
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR1 AbM

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ser Met Asn
 1 5 10

<210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa = Gln, Ala, Lys, hoặc His

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa = Asn, Ala, Tyr, Ile, Lys, hoặc Thr

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa = Val, Ala, Gly, hoặc Met

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa = Gly, Ser, Thr, hoặc Leu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa = Thr, Asn, Pro, hoặc Ala

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa = Asn hoặc Tyr

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa = Pro hoặc Leu

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa = Ser, Leu, hoặc Trp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa = Tyr, Asn, hoặc His

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa = Arg, Leu, Pro, hoặc His

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (55)..(55)
 <223> Xaa = Tyr, Ser, Gln, Lys, Phe, Pro, hoặc Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM_ MISC
 <222> (56)..(56)
 <223> Xaa = Ser, Gly, Ile, hoặc Arg

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

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

Tyr Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR1 AbM

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR2 Kabat

<400> 13

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR2 Kabat

<400> 14

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 Kabat

<400> 15

Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 Kabat

<400> 16

Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Val Glu Glu Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 Kabat

<400> 17

Trp Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 Chothia

<400> 18

Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 Chothia

<400> 19

Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 Chothia

<400> 20

Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 AbM

<400> 21

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr
 1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 AbM

<400> 22

Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr
 1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 AbM

<400> 23

Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn
 1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2 AbM

<400> 24

Trp Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Thr
 1 5 10

<210> 25

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 25

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 26

Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 27

Trp Asp Phe Val Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 28

Trp Asp Phe Tyr Trp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 29

Trp Asp Ala Phe Glu Tyr Val Lys Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 30

Trp Asp Phe Phe Glu Tyr Phe Lys Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 31

Trp Asp Phe Phe Tyr Tyr Val Gln Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 32

Trp Asp Phe Ser Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 33

Trp Asp Phe Ala His Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 34

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 35

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Leu Glu Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 36

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 37

Lys Ala Ser Ala Asn Val Gly Asn Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 38

Lys Ala Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 39

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala

1

5

10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Tyr Ala Ser Thr Asn Val Ala

1

5

10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 41

Lys Ala Ser His Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1

5

10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 42

Lys Ala Ser Gln Ile Met Gly Pro Asn Val Ala

1

5

10

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 43

Lys Ala Ser Gln Ile Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 44

Lys Ala Ser Gln Lys Val Leu Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 45

Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 46

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 47

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ser Gly
1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 48

Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Gln Ile
1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 49

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5

<210> 50

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 50

Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 51

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 52

Tyr Leu Ala Ser Tyr His Glu Ser
 1 5

<210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 53

Tyr Ser Ala Ser His Arg Pro Ser
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 54

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 55

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg
1 5

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR3

<400> 56

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 57
<211> 30
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1

<400> 57

ggatacacct tcactgagtt tggaatgaac

30

<210> 58

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1

<400> 58

ggatacacct tcactgagta tggatgaac

30

<210> 59

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1

<400> 59

ggatacacct tcactgagta ttctatgaac

30

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1

<400> 61

ggatacacct tcactgagtt tggaatgagc

30

<210> 62
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR2

<400> 62
 tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatgttgaag agtttaaggg a 51

<210> 63
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR2

<400> 63
 tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatattgaag agtttaaggg a 51

<210> 64
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR2

<400> 64
 tggataaaca ccaaaagtgg agaggcaaca tatgttgaag agtttaaggg a 51

<210> 65
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR2

<400> 65
 tatataaaca ccaaaaatgg agaggcaaac tatgttgaag agtttaaggg a 51

<210> 66
 <211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2

<400> 66

tgataaaca ccaaaaatgg agaggcaaca tatattgaag agttaaggg a 51

<210> 67

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 67

tggaacttct atgattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 68

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 68

tggaacttct atcattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 69

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 69

tggaacttcg tggattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 70

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 70

tgggacttct attggtacgt ggaggctatg gactac

36

<210> 71

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 71

tgggacgcct ttgagtacgt gaaggcgctg gactac

36

<210> 72

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 72

tgggatttct ttgagtattt taagactatg gactac

36

<210> 73

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 73

tgggactttt ttattacgt gcagactatg gactac

36

<210> 74

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 74

tgggattttt cttattacgt tgaggcgatg gactac

36

<210> 75

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 75

tgggactttg ctcattactt tcagactatg gactac

36

<210> 76

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 76

tgggacttcg cttattactt tcagactatg gactac

36

<210> 77

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3

<400> 77

tgggatttcg cgtattacct tgaggctatg gactac

36

<210> 78

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 78
aaggccagtc agaattgtggg tactaatgtt gcc 33

<210> 79
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 79
aaggccagtg ccaatgtggg taataatgtt gcc 33

<210> 80
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 80
aaggccagta agaattgtggg gactaatgtt gcg 33

<210> 81
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 81
aaggccagtg cggctgtggg tacgtatgtt gcg 33

<210> 82
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 82
aaggccagtc agatagcgag tactaatgtt gcc 33

<210> 83
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 83
 aaggccagtc acaatgtggg taccaacgtt gcg 33

<210> 84
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 84
 aaggccagtc agattatggg tcctaatgtt gcg 33

<210> 85
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 85
 aaggccagtc aaattgtggg tactaatgtt gcg 33

<210> 86
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 86
 aaggccagtc agaaggtgct tactaatgtt gcg 33

<210> 87
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1

<400> 87
 aaggccagtc agactgtgag tgctaatgtt gcg 33

<210> 88
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 88
 tattcggcat cctaccgcta cagt 24

<210> 89
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 89
 tatttggcct ccaacctctc cggc 24

<210> 90
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 90
 tacctggcat cctaccccca gatt 24

<210> 91
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 91
 tattcggcat cctaccgcaa aagg 24

<210> 92
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 92
 tattgggcat cctaccgcta tagt 24

<210> 93
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 93
 tattcggcat cccaccgcta cagt 24

<210> 94
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 94
 tatttggcat cctaccacga aagt 24

<210> 95
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 95

tattcggcat cccaccgtcc cagt

24

<210> 96

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 96

tatttggcat cctaccgcta cagt

24

<210> 97

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR2

<400> 97

tatttggcat cctaccgcta caga

24

<210> 98

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR3

<400> 98

caccaatatt acacctatcc tctattcacg

30

<210> 99

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PR1A3 VH

<400> 99

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 100

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pEM1496 huPR1A3 VH

<400> 100

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH7A

<400> 101

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 102

<211> 98

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IGHV7-4-1*02

<400> 102

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 103

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PR1A3 VL

<400> 103

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 104

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pEM1495 huPR1A3 VL

<400> 104

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 105

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CL1A

<400> 105

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 106

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IMGT_hVK_1_39

<400> 106

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

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

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

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

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

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

<210> 107

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH7 rF9

<400> 107

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 108

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CLA1 rH11

<400> 108

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 109

<400> 109
 000

<210> 110

<400> 110
 000

<210> 111

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PR1A3 VH

<400> 111

caggtgaagc tgcagcagtc aggacctgag ttgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctggata taccttcaca gaattcggaa tgaactgggt gaagcaggct 120

cctggaaagg gtttaaagt gatgggctgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaaggagc gttgccttc tcttggaga cctctgccac cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctaaat atttctgtgc tcgatgggat 300

ttctatgact atgtgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360

tca

363

<210> 112

<211> 362

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pEM1496

<400> 112

caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttact gagttggaat gaactgggtg cgacaggccc 120

ctggacaagg gcttgagtgg atgggatgga taaacaccaa aactggagag gcaacatatg 180

ttgaagagtt taaggagcgg ttgtcttct ccttgacac ctctgtcagc acggcatatc 240

tgcagatcag cagcctaaag gctgacgaca ctgccgtgta ttactgtgcg agatgggact 300

tctatgatta cgtggaggct atggactact ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct 360

ca

362

<210> 113

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH7A

<400> 113

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggagge tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 114

<211> 294

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IGHV7-4-1*02

<400> 114

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact agctatgcta tgaattgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atcaacacca aactgggaa cccaacgtat 180
 gccaggggt tcacaggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gaga 294

<210> 115

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PR1A3 VL

<400> 115

gatatcgtga tgaccagtc tcaaagattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtatca acagaaacca 120

ggacaatccc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtacagtct 240
 gaagacttgg cggagtattt ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgttcggc 300
 tcggggacaa agttggaaat gaaacgtacg 330

<210> 116
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pEM1495

<400> 116
 gacatccaga tgactcagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60
 atcacctgta aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtacca gcagaagcca 120
 ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcctacc ggtacagtgg tgtgccaagc 180
 agattcagcg gtagcggtag cggtagcgac ttacattca ccatcagcag cctccagcca 240
 gaggacatcg ccactacta ctgccaccaa tattacacct atcctctatt cagcttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaacgt 327

<210> 117
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CL1A

<400> 117
 gatatccaga tgaccagtc tccatctec ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagtcct gatctattcg gcatcctacc gctacagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caag

324

<210> 118

<211> 285

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IMGT_hVK_1_39

<400> 118

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccct 285

<210> 119

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH7 rF9

<400> 119

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg ctcttgata cacccttact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtctc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tcagctagc

369

<210> 120

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CLA1 rH11

<400> 120

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc gactgtgagt gctaatgttg cgtggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcatcctacc gctacagagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 121

<211> 987

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IgG1

<400> 121

accaagggcc catcggtctt cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 60
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttcccgaac cggtagcggg gtcgtggaac 120
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccggctg tctacagtc ctcaggactc 180
 tactcctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 240
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagcaga gccc aaatct 300
 ttgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 360
 gtcttctct tcccccaaa accaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 420
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 480
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 540
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 600
 aagtgaagg tctccaacaa agcctccca gcccctatcg agaaaaccat ctcaaagcc 660

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 720
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg 780
 gagtgggaga gcaatgggca gccgggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 840
 tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 900
 gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cacgcagaag 960
 agcctctccc tgtctccggg taaatga 987

<210> 122
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IgG1

<400> 122

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 1 5 10 15

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala
 85 90 95

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 100 105 110

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 115 120 125

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 130 135 140

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 165 170 175

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 180 185 190

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 195 200 205

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 260 265 270

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 275 280 285

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 290 295 300

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 123

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi MS-43

<400> 123

ccagccggcc atggccgata tccagatgac ccagtctcca tc 42

<210> 124

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi MS-52

<400> 124

gaagaccgat gggcctttgg tgctag 26

<210> 125

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi MS-55

<400> 125

gcaacatatg ttgaagagtt taaggacgg 30

<210> 126

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MS-56

<400> 126

atgaactggg tgcgacaggc ccctg

25

<210> 127

<211> 56

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi EAB-679

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (26)..(26)

<223> m là a hoặc c

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (27)..(28)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (30)..(30)

<223> w là a hoặc t

<400> 127

caggggcctg tcgcacccag ttcattmnaw actcagtgaa ggtgtatcca gaagcc

56

<210> 128

<211> 81

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi EAB-680

<400> 128

ccgtccctta aactcttcaa cataggttgc ctctccagtt ttggtgttta tccatcccat

60

ccactcaagc cctgtgccag g

81

<210> 129

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi EAB-685

<400> 129

cagctatgac catgattacg ccaagcttgc atgcaaattc tatttcaagg 50

<210> 130

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi EAB-686

<400> 130

gttgctgtgt atcagcagaa accaggg 27

<210> 131

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi EAB-687

<400> 131

gctctttgtg acgggcgagc tcaggccctg atgg 34

<210> 132

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi EAB-688

<400> 132

ggagtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgg 35

<210> 133

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi EAB-681

<400> 133

cctggtttct gctgatacca cgcaacatta gtacccacat tctgactggc cttgcaagtg 60

atggtgactc

70

<210> 134

<211> 77

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi EAB-682

<400> 134

ctgccactga acctgatgg gactccactg tagcggtagg atgccgaata gatcaggagc 60

ttaggtgctt tccctgg

77

<210> 135

<211> 64

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi AC7

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (37)..(37)

<223> m là a hoặc c

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (38)..(39)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 135

ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaagtcmmnt ctcgcacagt aatacacggc 60

agtg

64

<210> 136

<211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC8

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (34)..(34)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 136
 ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaamnccat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg 64

<210> 137
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC9

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (31)..(31)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 137
 ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata mnngtcccat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg 64

<210> 138

<211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi AC10-

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (28)..(28)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (29)..(30)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 138
 ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcmnn gaagtccecat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg 64

<210> 139
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi AC11

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (25)..(25)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (26)..(27)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 139
 ccagtagtcc atagcctcca cgtamnnata gaagtccecat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg 64

<210> 140

<211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC12

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (37)..(37)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (38)..(39)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 140
 cgtggtcctt tggccccagt agtccatagc ctccacmna tcatagaagt cccatctgc 60

acag 64

<210> 141
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC13

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (34)..(34)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 141
 cgtggtcctt tggccccagt agtccatagc ctemnngtaa tcatagaagt cccatctgc 60

acag 64

<210> 142

<211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC14

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (31)..(31)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 142
 cgtggtcctt tggccccagt agtccatagc mnnacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60

acag 64

<210> 143
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC15

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (28)..(28)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (29)..(30)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 143
 cgtggtcctt tggccccagt agtccatmnn ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60

acag 64

<210> 144

<211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC16

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (25)..(25)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (26)..(27)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 144
 cgtggtcctt tggccccagt agtcmnnagc ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60

acag 64

<210> 145
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC17

<400> 145
 cgtggtcctt tggccccagt agtccatagc ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60

acagtaatac acggcag 77

<210> 146
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi EAB-749

<400> 146
 ccatcagggc ctgagctcgc ccgtc 25

<210> 147
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi EAB-750

<400> 147
 cgtggaggct atggactact ggggccaagg 30

<210> 148
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi EAB-751

<400> 148
 gactactggg gccaaaggac cacggcac 29

<210> 149
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi EAB-752

<400> 149
 ggtcagggcg cctgagttcc acg 23

<210> 150
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi AC1

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (37)..(37)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (38)..(39)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 150
 ggtgccctgg ccaaactga atagaggata ggtgtamnt tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 151
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi AC2

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (34)..(34)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 151
 ggtgccctgg ccaaactga atagaggata ggtmnnatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 152
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi AC3

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (31)..(31)
 <223> m là a hoặc c

<220>
 <221> đặc điểm_misc
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 152

gggtgccctgg ccaaactga atagaggata mnngtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 153

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi AC4

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (28)..(28)

<223> m là a hoặc c

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (29)..(30)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 153

gggtgccctgg ccaaactga atagaggmn ggtgtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 154

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi AC5

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (22)..(22)

<223> m là a hoặc c

<220>

<221> đặc điểm_misc

<222> (23)..(24)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 154

gggtgccctgg ccaaactga amnnaggata ggtgtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 155
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi AC6

<400> 155
 ggtgccctgg ccaaactga atagaggata ggtgtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 156
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi EAB-746

<400> 156
 cgcttgatct cgagcttggg gccctggcca aacgtg 36

<210> 157

<400> 157
 000

<210> 158
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pETR6592

<400> 158

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
 35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
 50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
 85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

Met Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr
 165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
 180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile
 195 200 205

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser
 210 215 220

Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn
 225 230 235 240

Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr
 245 250 255

Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr
 260 265 270

Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Leu Ser
 275 280 285

Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr
 290 295 300

Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly
 305 310 315 320

Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu
 325 330 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Ile Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
 340 345 350

Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile
 355 360 365

Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala
 370 375 380

Leu Pro Gln Glu Asn Leu Ile Asn Val Asp Leu Glu Val Leu Phe Gln
 385 390 395 400

Gly Pro Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
 405 410 415

Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His
 420 425

<210> 159

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PMS22

<400> 159

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctcttgata caccttact gagtttgaa tgaactgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gtgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatgatt acgtggagcg tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 160

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi 1C8

<400> 160

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctcttgata caccttact gagtttgaa tgaactgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gtgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatcatt acgtggagcg tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 161

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 3E1

<400> 161

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttcgtggatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 162

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 2D7

<400> 162

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctattggt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 163

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng có ái lực hoàn thiện

<400> 163

caggtgcaat tggcgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg ctctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttgctcatt acttcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 164

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng có ái lực hoàn thiện

<400> 164

caggtgcaat tggcgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg ctctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttgcttatt acttcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 165

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng có ái lực hoàn thiện

<400> 165

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctcttgata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300

ttcgcgtatt acctgaggc tatggactac tggggccaag ggaccacgat caccgtctcc 360

tca 363

<210> 166

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H3 đầy đủ (5) 19

<400> 166

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctcttgata caccttcaact gagtttgaa tgagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac 300

gccttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 167

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H3 đầy đủ (5) 8

<400> 167

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctcttgata caccttact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 ttcttgagt attttaagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 168
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H3 đầy đủ (5) 28

<400> 168
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttttttatt acgtgcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 169
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H3 đầy đủ (5) 27

<400> 169
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 tttcttatt acgttgaggc gatggactac tggggccaag ggaccacagt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 170
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H4E9 Chuỗi nặng

<400> 170
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaatacca aaactggaga ggcaacttat 180
 attgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 171
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pAC14 (B9)

<400> 171
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaagtggaga ggcaacctat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 172
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pAC15 (F9)

<400> 172
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttact gagtatgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 173
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H1/H2 (5) 2

<400> 173
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttact gagtattcta tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatac ataaacacca aaaatggaga ggcaaactat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggagge tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 174
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H1/H2 (5) 11

<400> 174
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttact gagtatggta tgaactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaaatggaga ggcaacctat 180
 attgaagagt ttaaggagc gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggagge tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 175
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H1/H2 (5) 13

<400> 175
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttact gagtttgga tgaactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggat ataaacacca aaaatggaga ggcaaactat 180
 gttgaagagt ttaaggagc gttgtcttc tccttgacg cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatgatt acgtggagge tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 176
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> H1/H2 (5) 14

<400> 176
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg ctcttgata caccttcaact gaggatgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatata ataacacca aaaatggaga ggcaaatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggagge tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 177
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> H3 đầy đủ (5) 19

<400> 177
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg ctcttgata caccttcaact gaggttgga tgagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac 300
gcctttgagt acgtgaagge gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 178

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC21 (3A1)

<400> 178

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtgc caatgtgggt aataatgttg cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcctccaacc gctccggtgg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 179

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC19 (2C6)

<400> 179

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtaa gaatgtgggg actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagcccct gatctacctg gcatcctacc cccagattgg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atccctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 180

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC18 (2F1)

<400> 180

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtc ggctgtgggt acgtatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcacctacc gcaaaagggg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 181

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC23 (2F11)

<400> 181

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtc gatagcgagt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattgg gcacctacc gctatagtgg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 182

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ H4E9

<400> 182

gatatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagcccct gatctattcg gcacccacc gctacagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 183

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> L2D2

<400> 183

gatatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca caatgtgggt accaacgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcacccacc ggtacagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 184

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC6 (C1)

<400> 184

gatatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gattatgggt cctaattgtg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcacccacc acgaaagtgg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 185

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC7 (E10)

<400> 185

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtca aattgtgggt actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcccacc gtcccagtgg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 186

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC12 (H7)

<400> 186

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtca gaaggtgctt actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatcctacc gtacagtgg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 187
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pAC13 (H11)

<400> 187
 gaataccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcaacttga aggccagtc gactgtgagt gctaattgtg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcatcctacc gctacagagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttaactctca ccatcagcag tetgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 188
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PMS22

<400> 188

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 189

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 1C8

<400> 189

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 190

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 3E1

<400> 190

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 191
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2D7

<400> 191

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 192
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng có ái lực hoàn thiện

<400> 192

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 193

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng có ái lực hoàn thiện

<400> 193

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 194

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng có ái lực hoàn thiện

<400> 194

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 195

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H3 đầy đủ (5) 19

<400> 195

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 196

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H3 đầy đủ (5) 8

<400> 196

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Phe Glu Tyr Phe Lys Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 197
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H3 đầy đủ (5) 28

<400> 197

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Phe Tyr Tyr Val Gln Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 198
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H3 đầy đủ (5) 27

<400> 198

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 199

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng H4E9

<400> 199

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 200

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC14 (B9)

<400> 200

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 201

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC15 (F9)

<400> 201

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 202

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H1/H2 (5) 2

<400> 202

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 203

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H1/H2 (5) 11

<400> 203

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 204

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H1/H2 (5) 13

<400> 204

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Ala Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 205

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H1/H2 (5) 14

<400> 205

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 206

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H3 đầy đủ (5) 19

<400> 206

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 207

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC21 (3A1)

<400> 207

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 208

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC19 (2C6)

<400> 208

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 209

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC18 (2F1)

<400> 209

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 210

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC23 (2F11)

<400> 210

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 211

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H4E9 chuỗi nhẹ

<400> 211

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 212

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> L2D2

<400> 212

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser His Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 213
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pAC6 (C1)

<400> 213

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ile Met Gly Pro Asn
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 214
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pAC7 (E10)

<400> 214

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 215

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC12 (H7)

<400> 215

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Lys Val Leu Thr Asn
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 216

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pAC13 (H11)

<400> 216

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 217
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng PR1A3 (Y98A) CDR3

<400> 217

Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 218
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng PR1A3 (D99Y) CDR3

<400> 218

Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 219
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng PR1A3 (D99H) CDR3

<400> 219

Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 220
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng PR1A3 (V101F) CDR3

<400> 220

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 221

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng PR1A3 (E101aQ) CDR3

<400> 221

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 222

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng PR1A3 (A103T) CDR3

<400> 222

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 223

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng PR1A3 (Y98A / D99Y) CDR3

<400> 223

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 224
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng PR1A3 (W95Y) CDR3

<400> 224

Tyr Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 225
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (Y98A)

<400> 225

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 226

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (D99Y)

<400> 226

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 227

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (D99H)

<400> 227

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 228

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (V101F)

<400> 228

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 229

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (E102Q)

<400> 229

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 230

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (A103T)

<400> 230

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 231

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (Y98A / D99Y)

<400> 231

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 232

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (W95Y)

<400> 232

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 233
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CH1A1A (Y98A)

<400> 233

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 234
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CH1A1A (D99Y)

<400> 234

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 235

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1A (D99H)

<400> 235

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 236

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1A (V101F)

<400> 236

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 237

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1A (E102Q)

<400> 237

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 238

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1A (A103T)

<400> 238

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 239

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1A (Y98A / D99Y)

<400> 239

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 240

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1A (W95Y)

<400> 240

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 241

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B (Y98A)

<400> 241

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 242

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B (D99Y)

<400> 242

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 243

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B (D99H)

<400> 243

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 244

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B (V101F)

<400> 244

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 245

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B (E102Q)

<400> 245

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 246

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B (A103T)

<400> 246

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 247

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B (Y98A / D99Y)

<400> 247

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 248

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B (W95Y)

<400> 248

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 249

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (Y98A)

<400> 249

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttcgtgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 250

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (D99Y)

<400> 250

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctattatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 251

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (D99H)

<400> 251

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatcatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 252

<211> 364

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (V101F)

<400> 252

ccaggtgcag ctggtgcaat ctgggtctga gttgaagaag cctggggcct cagtgaaggt 60
 ttctgcaag gcttctggat acaccttcac tgagtttga atgaactggg tgcgacaggc 120
 ccctggacaa gggcttgagt ggatgggatg gataaacacc aaaactggag aggcaacata 180
 tgttgaagag ttttaaggac ggtttgtctt ctcttggac acctctgtca gcacggcata 240
 tctgcagatc agcagcctaa aggctgaaga cactgccgtg tattactgtg cgagatggga 300
 ctctatgat tacttcgagg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 360
 ctca 364

<210> 253

<211> 364

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (E102Q)

<400> 253

ccaggtgcag ctggtgcaat ctgggtctga gttgaagaag cctggggcct cagtgaaggt 60
 ttctgcaag gcttctggat acaccttcac tgagtttga atgaactggg tgcgacaggc 120
 ccctggacaa gggcttgagt ggatgggatg gataaacacc aaaactggag aggcaacata 180
 tgttgaagag ttttaaggac ggtttgtctt ctcttggac acctctgtca gcacggcata 240
 tctgcagatc agcagcctaa aggctgaaga cactgccgtg tattactgtg cgagatggga 300
 ctctatgat tacttcgagg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 360
 ctca 364

<210> 254

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (A103T)

<400> 254

caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 255

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (Y98A / D99Y)

<400> 255

caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttgccttatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 256

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chuỗi nặng CH7A (W95Y)

<400> 256

caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttact gagtttgaa tgaactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctetgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatacgac 300
 ttctatgatt acgtggagge tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 257

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1

<400> 257

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 258

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A2

<400> 258

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 259

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A3

<400> 259

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 260

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A4

<400> 260

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 261

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1A

<400> 261

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 262

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B

<400> 262

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 263

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1C

<400> 263

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 264

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1D

<400> 264

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 265
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CH1A1E

<400> 265

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 266
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CH1A1F

<400> 266

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 267

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1G

<400> 267

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 268

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1

<400> 268

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

ttctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagtctggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accctggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc

363

<210> 269
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CH1A2

<400> 269
 caggtcaaac tgcagcagag cggccctgag ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggca 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 270
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CH1A3

<400> 270
 caggtgcagc tgggtcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt caagcaggcc 120
 cctggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 271
 <211> 362

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A4

<400> 271

aggtgcagct ggtgcagtct ggcgccgaag tgaagaaacc tggcgccagc gtgaagggtg 60

cctgcaaggc cagcggctac accttcaccg agttcggcat gaactgggtc cgacaggcac 120

caggccaggg cctcgaatgg atgggctgga tcaacaccaa gaccggcgag gccacctacg 180

tggaagagtt caagggcaga ttgccttca gcctggaaac cagcgccacc accgcctacc 240

tgcagatcaa caacctgaag aacgaggata ccgccaagta cttctgcgcc agatgggact 300

tttacgatta cgtggaagcc atggactact ggggccaggg caccaccgtg accgtgtcta 360

gc

362

<210> 272

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1A

<400> 272

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60

ttctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gatttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc

363

<210> 273

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1B

<400> 273

caggtgaagc tgcagcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccageggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccagggcagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgacatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc

363

<210> 274

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1C

<400> 274

caggtgcagc tgggtcagtc tggccccgaa ctgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccageggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccagggcagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgacatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc

363

<210> 275

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1D

<400> 275

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagagac tgtgaagatc 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gaggtcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc 363

<210> 276

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1E

<400> 276

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gaggtcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag attcaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc 363

<210> 277

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1F

<400> 277

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

ctggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc 363

<210> 278

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A1G

<400> 278

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaaatcc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc 363

<210> 279

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A

<400> 279

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 280

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1A

<400> 280

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgcctc ggtgaaggtc 60

tcttgaagg cctctgggta cacatttacg gaattcggga tgaattgggt cagacaagca 120

cctgggcaag ggctcgagtg gatgggatgg ataaacacga agacaggcga ggccacctac 180

gtagaagagt tcaaaggaag ggtcacgatg accacagata cttctacctc tactgcgtat 240

atggaactac ggagcttgcg tagcgatgac acagcgggtg actattgtgc tcgatgggat 300

ttctatgact atgttgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360

tca 363

<210> 281

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PR1A3

<400> 281

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

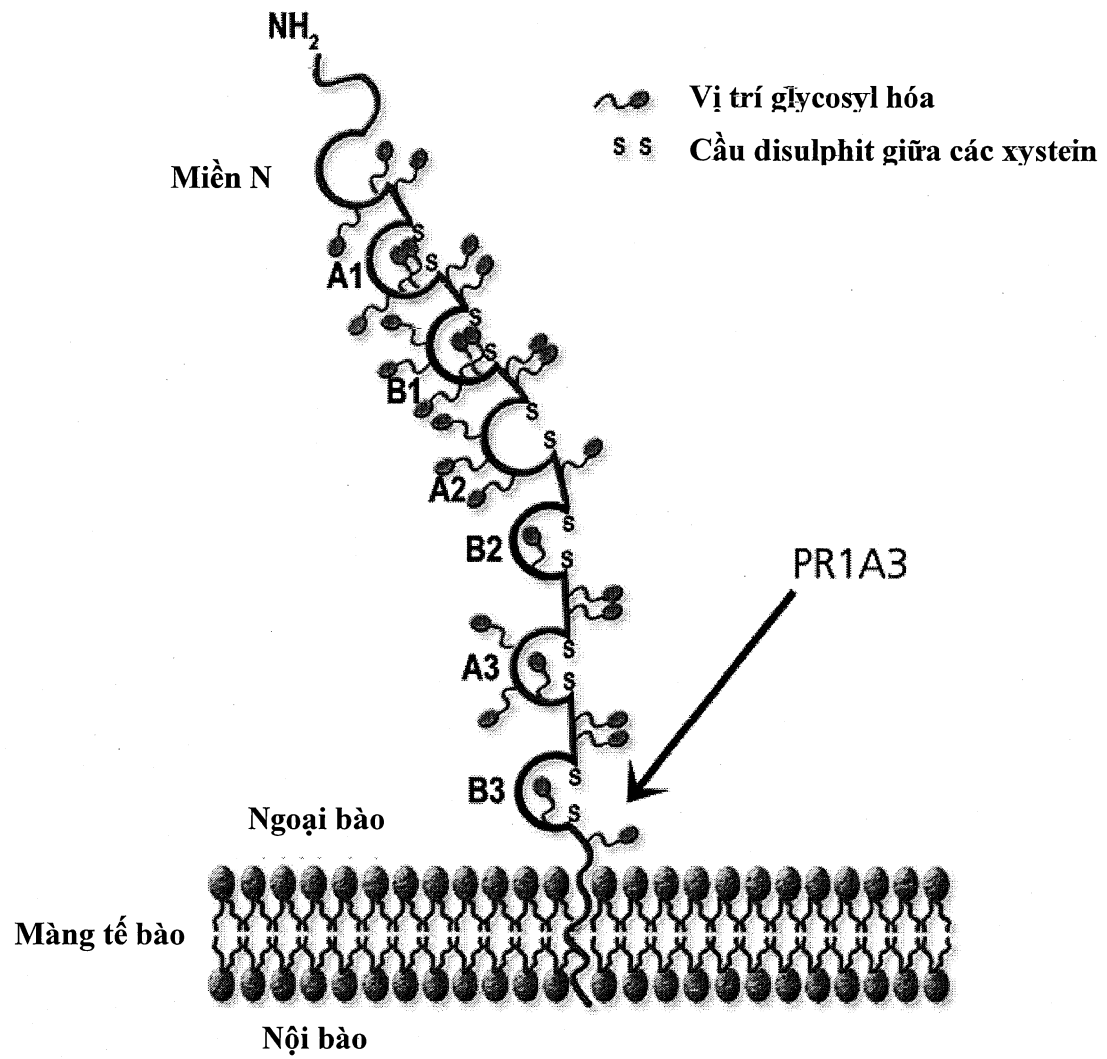


Fig. 1

**Caxinom ruột kết Lovo như các tế bào đích đối với ADCC
giải phóng LDH, thử nghiệm 4-giờ, huPBMC như chất hiệu ứng**

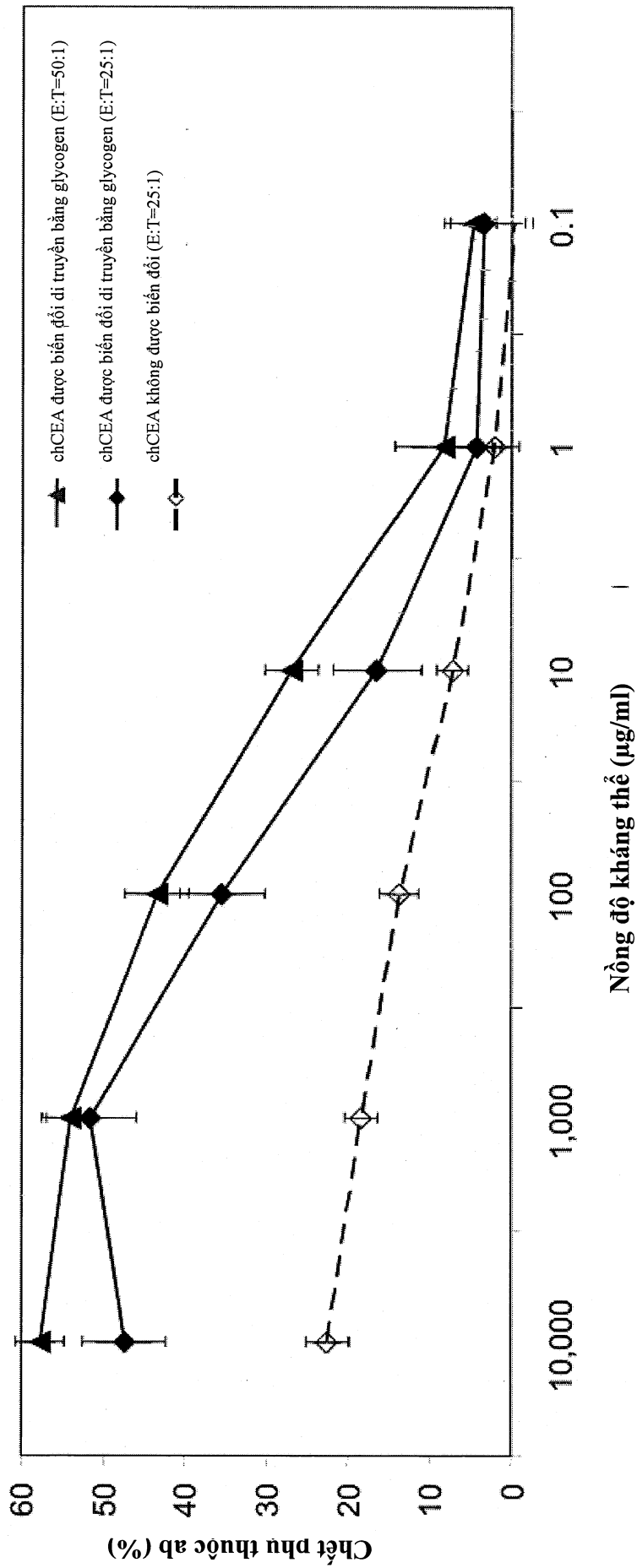


Fig. 2

Gắn kết với các tế bào caxinom ruột kết người Lovo được đo bằng FACS

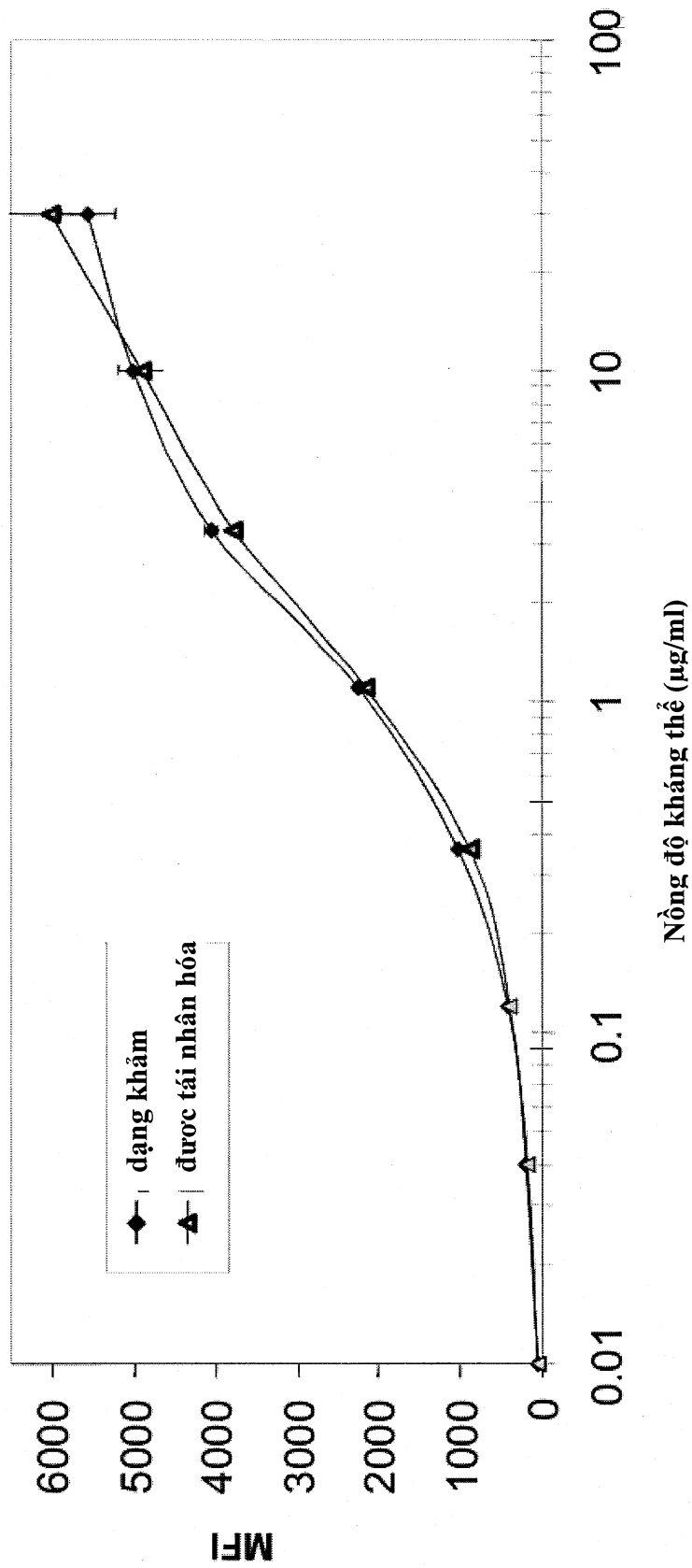


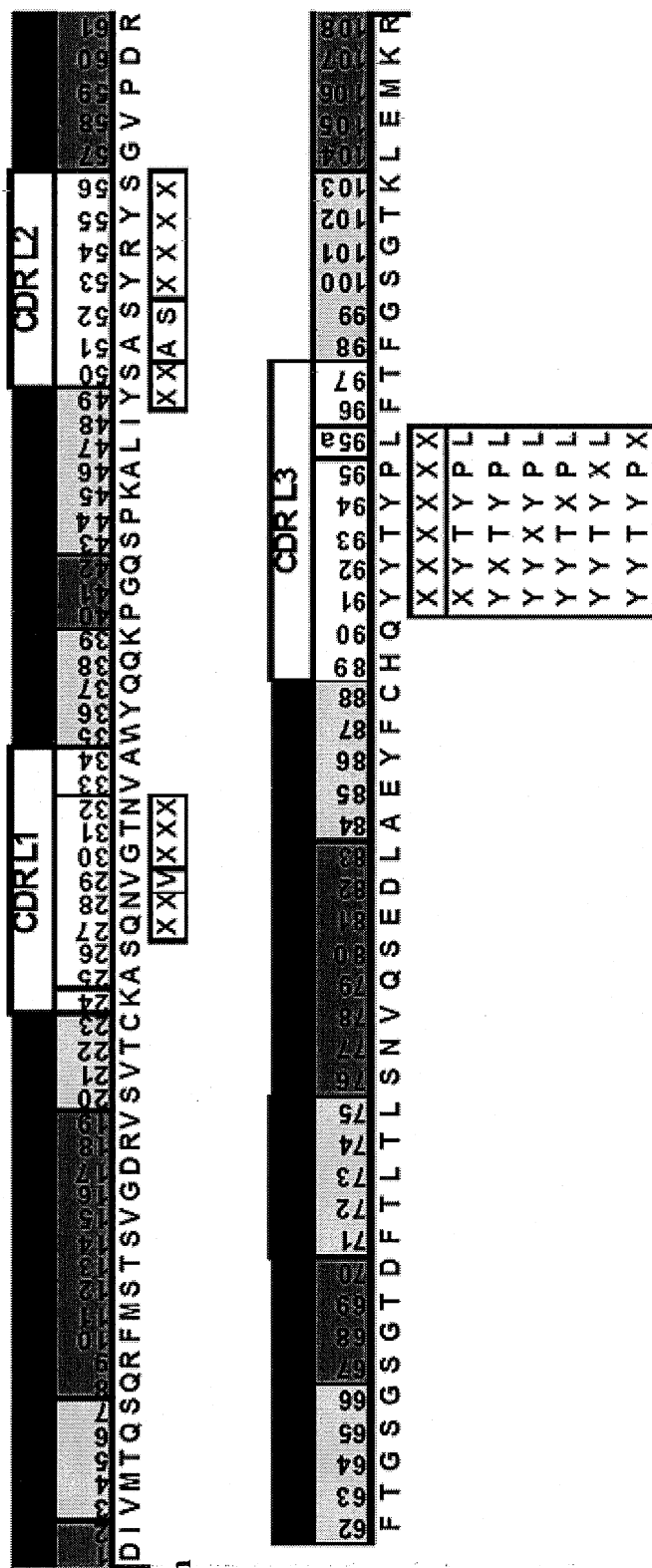
Fig. 3

VL'S

Kabat V

PRI3-VL

Các vị trí ngẫu nhiên





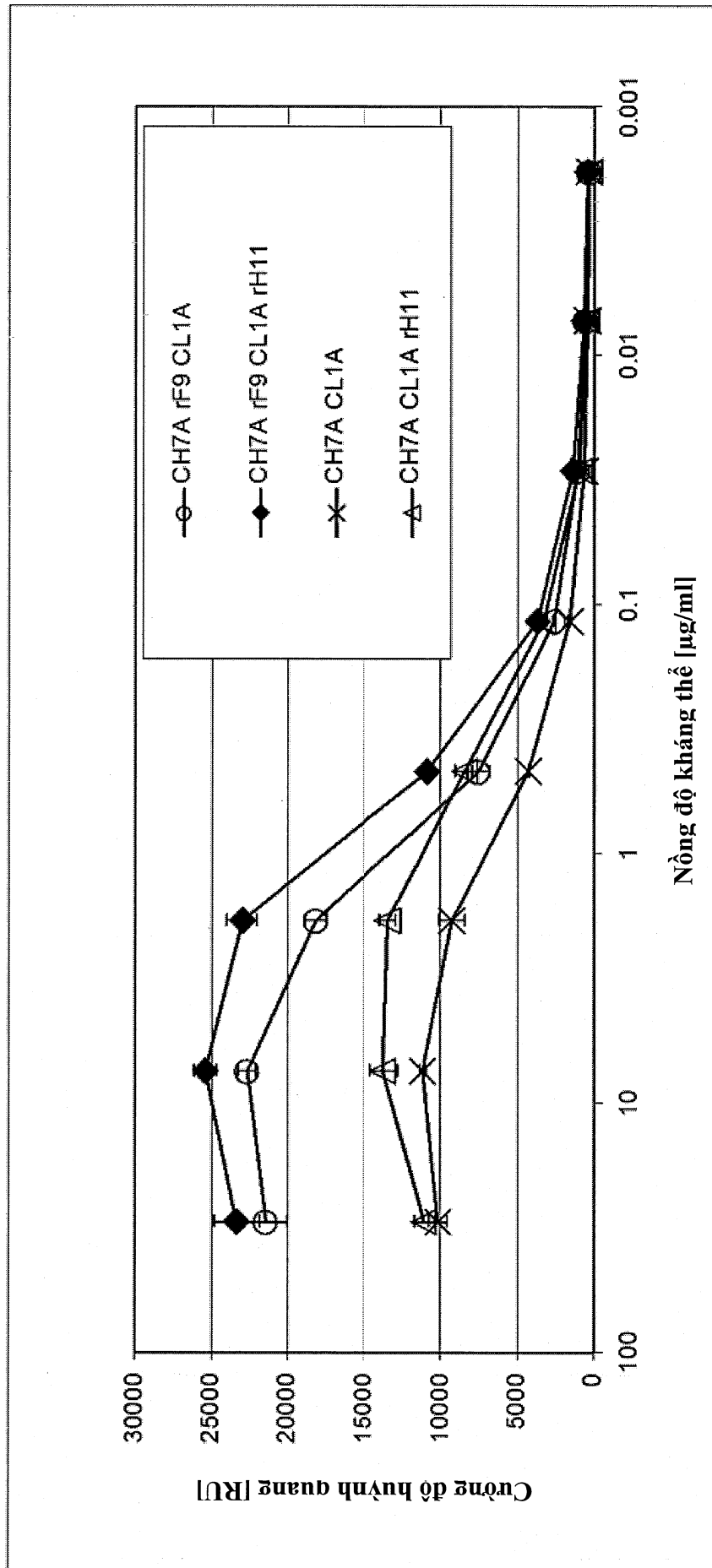


Fig. 6

Kiểu di căn gan LS174T

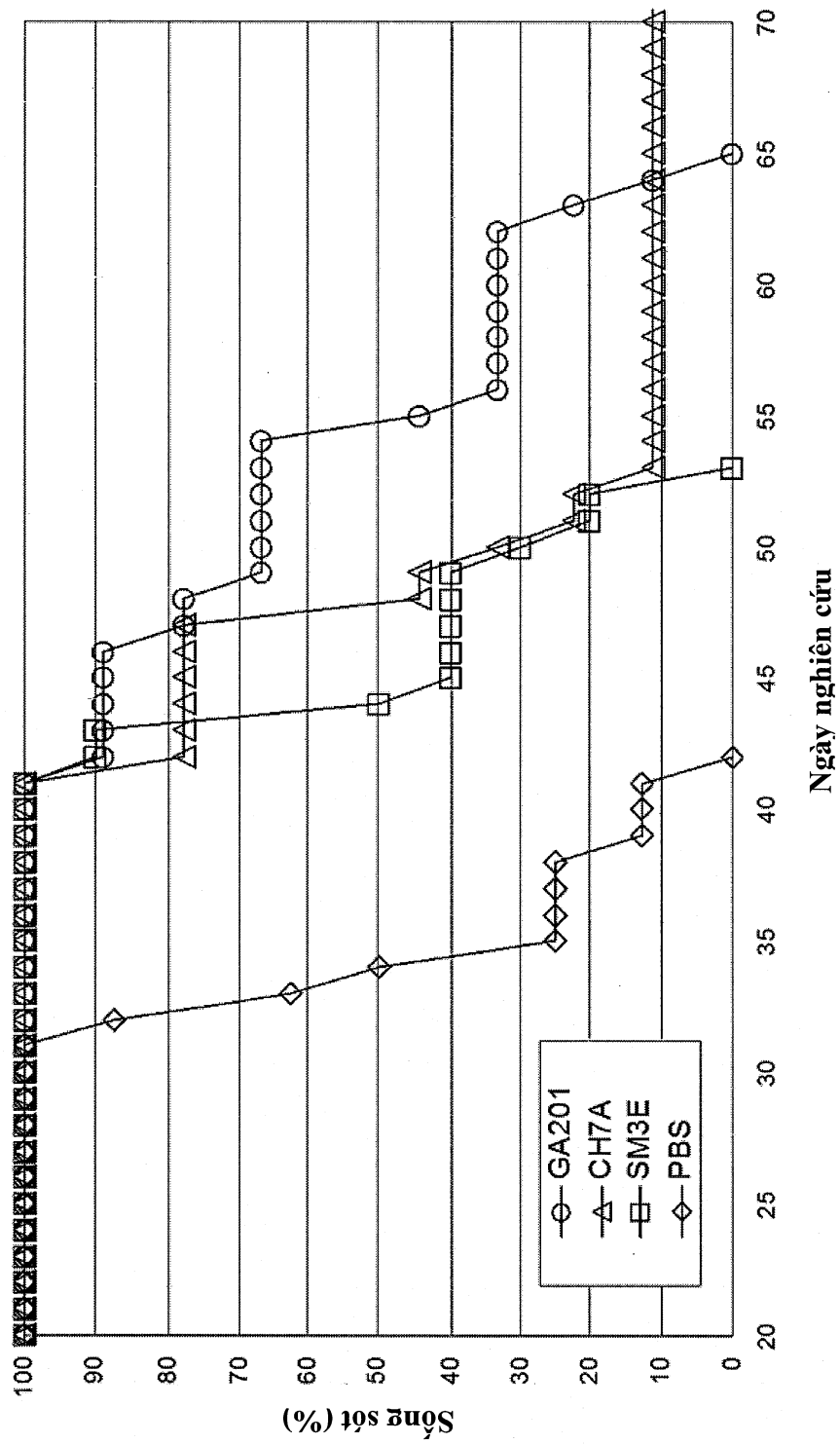


Fig. 7

Kiểu di căn phổi A549

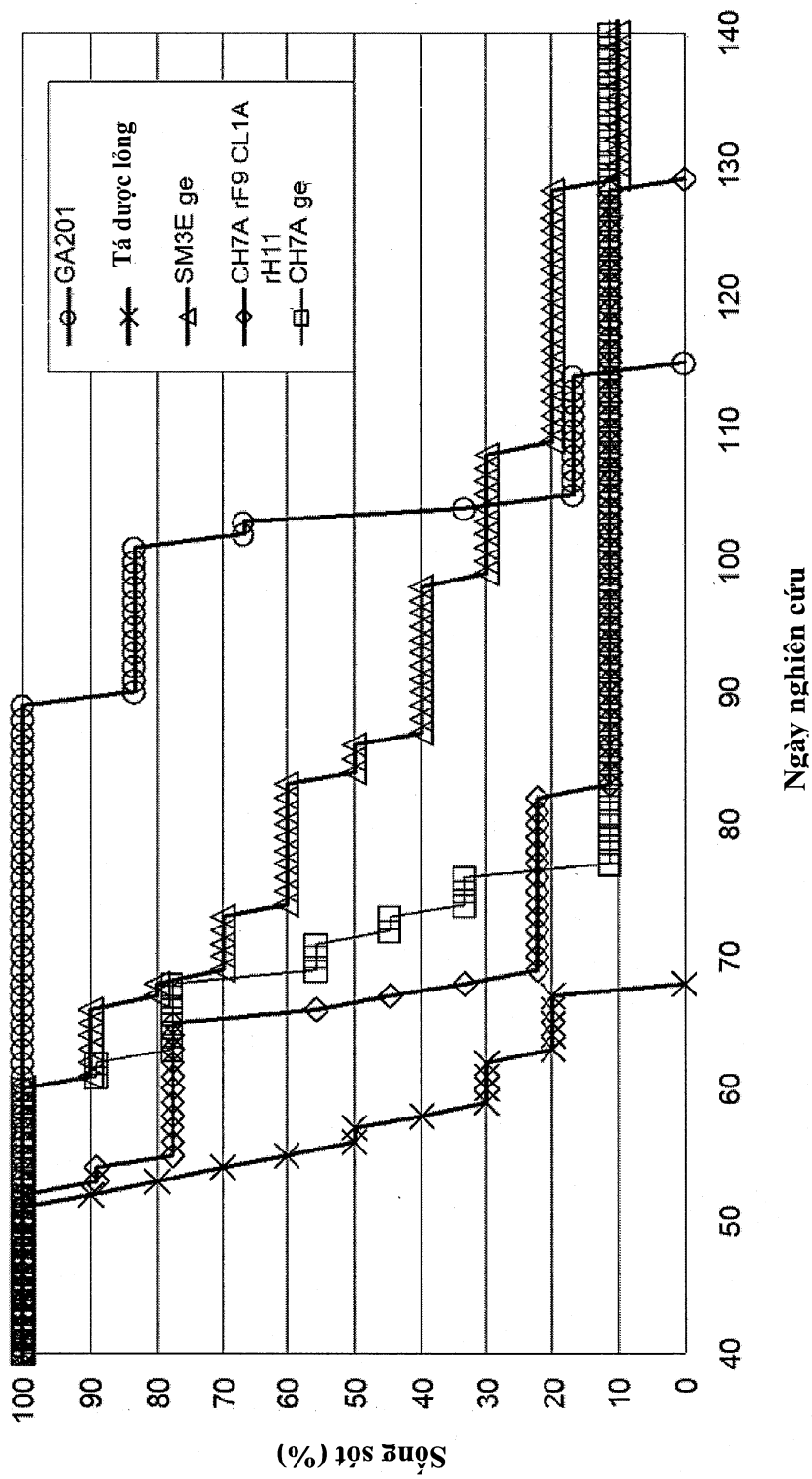


Fig. 8

Kiểu di căn gan MKN45

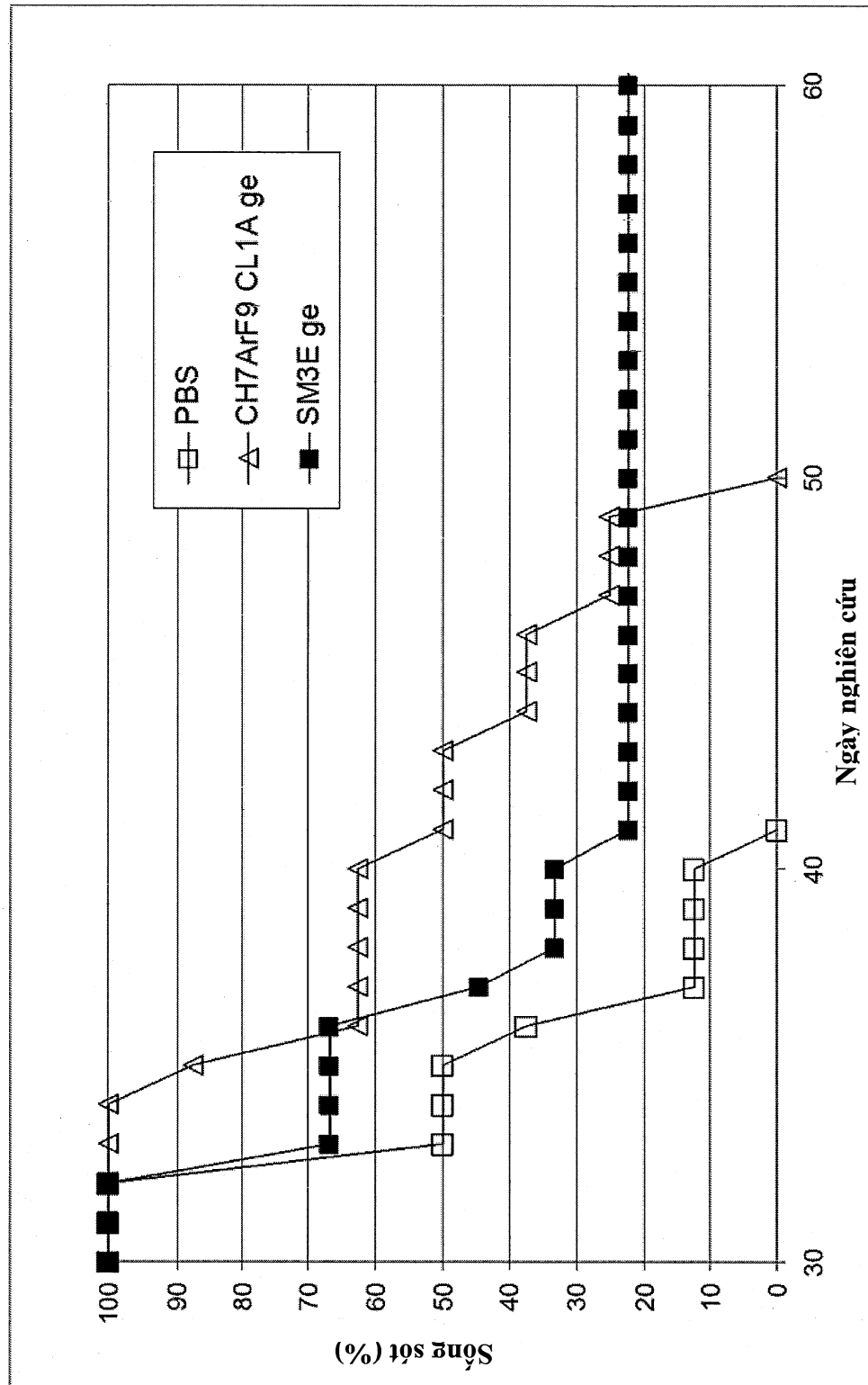


Fig 9

Cảm biến Fabs kháng CEA

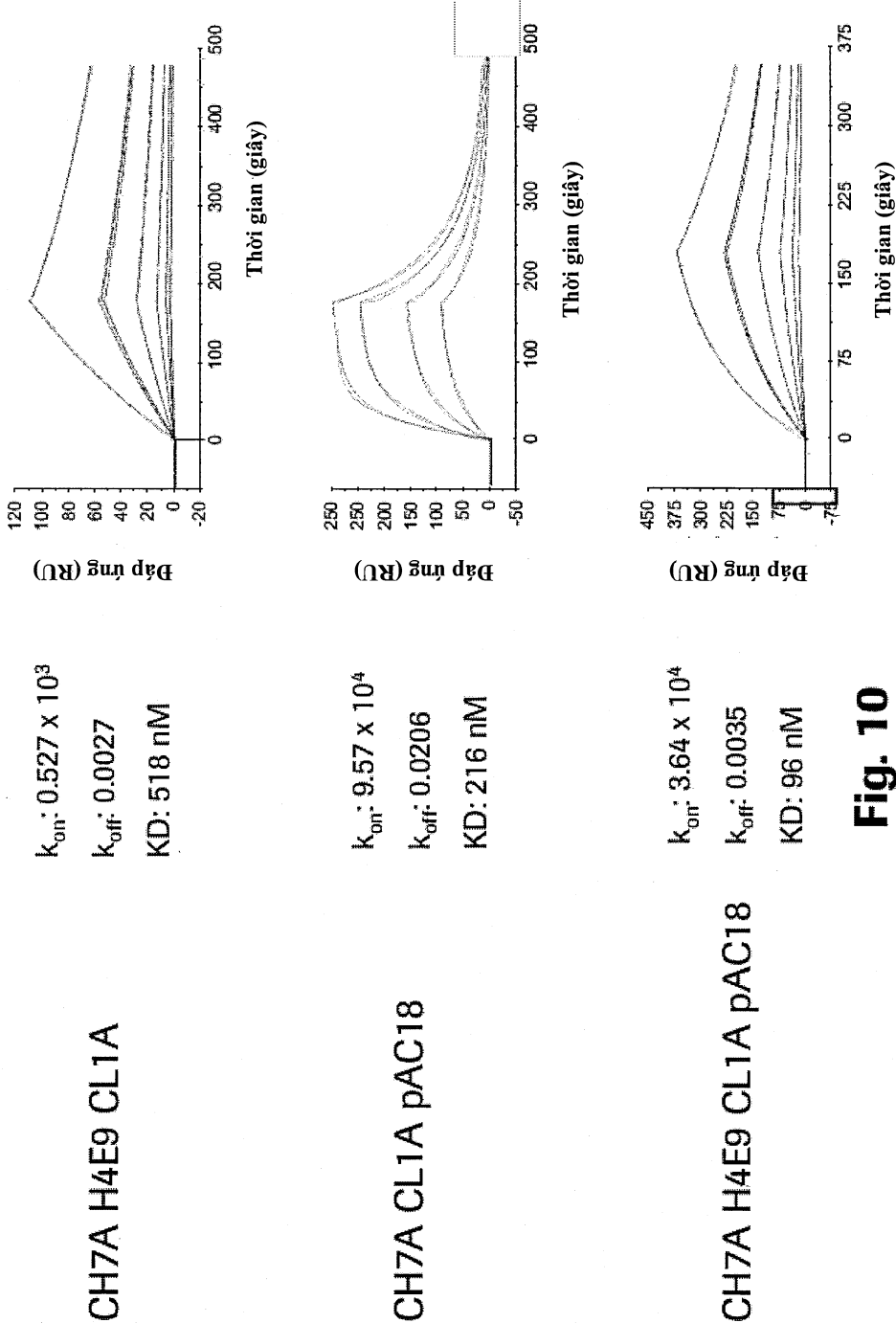


Fig. 10

CDR1 và CDR2 VH (CH7A) ngẫu nhiên

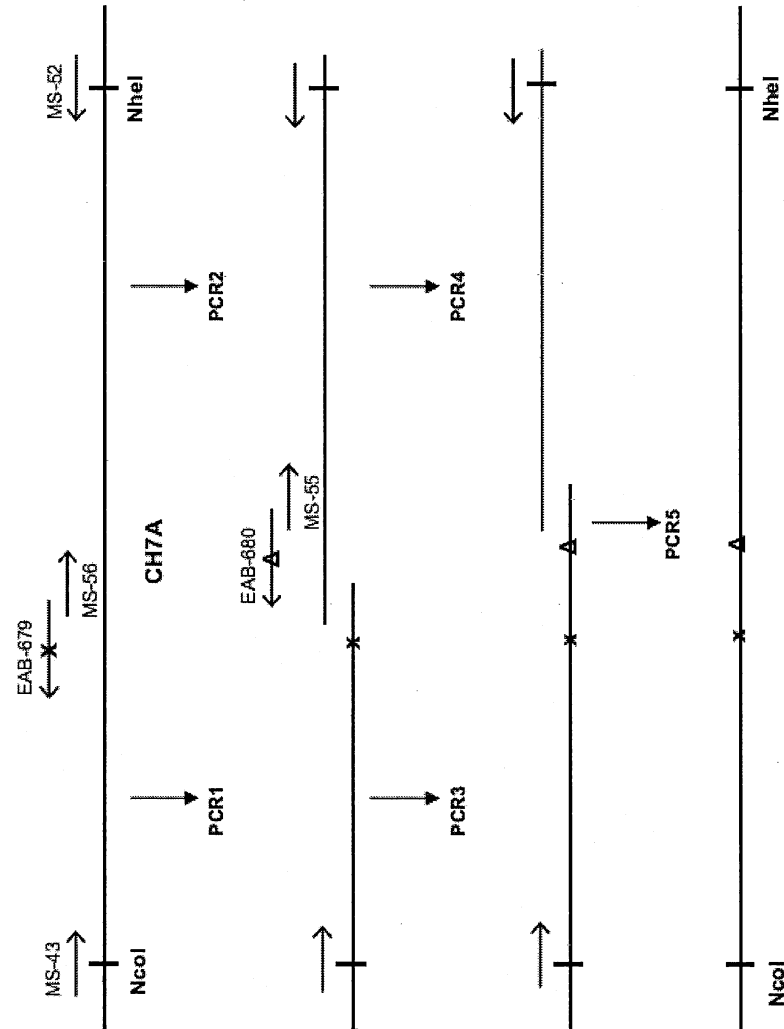


Fig. 11

CDR1 và CDR2 VL (CL1A) ngẫu nhiên

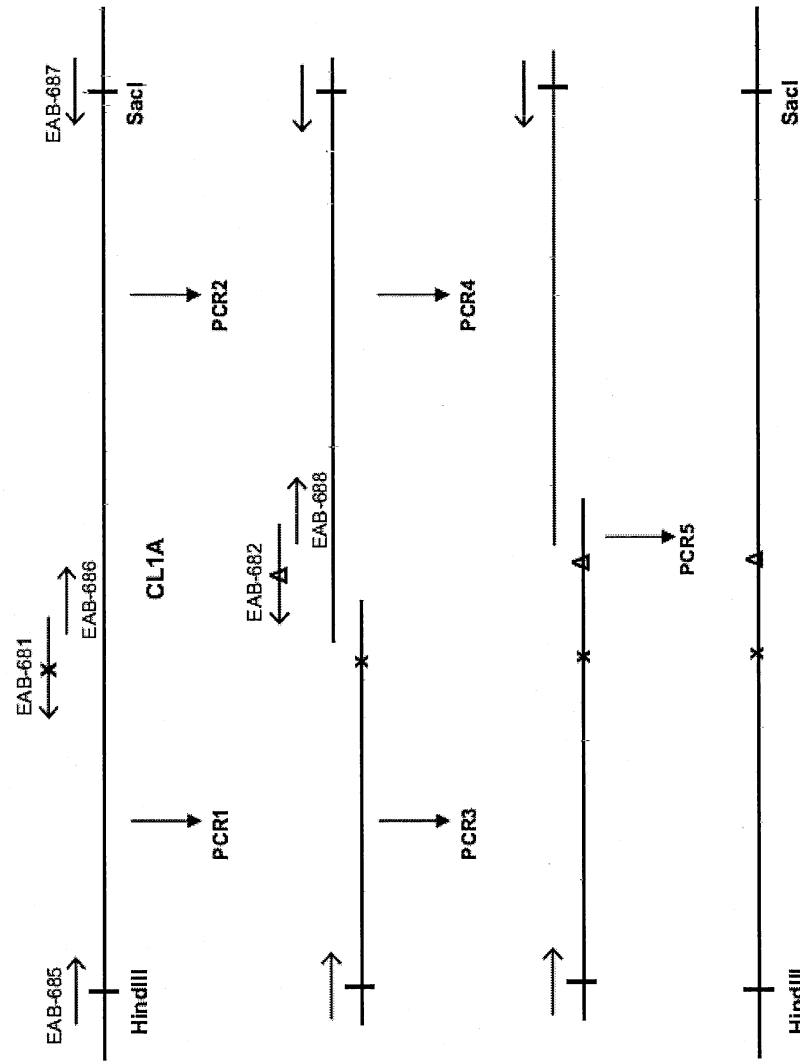
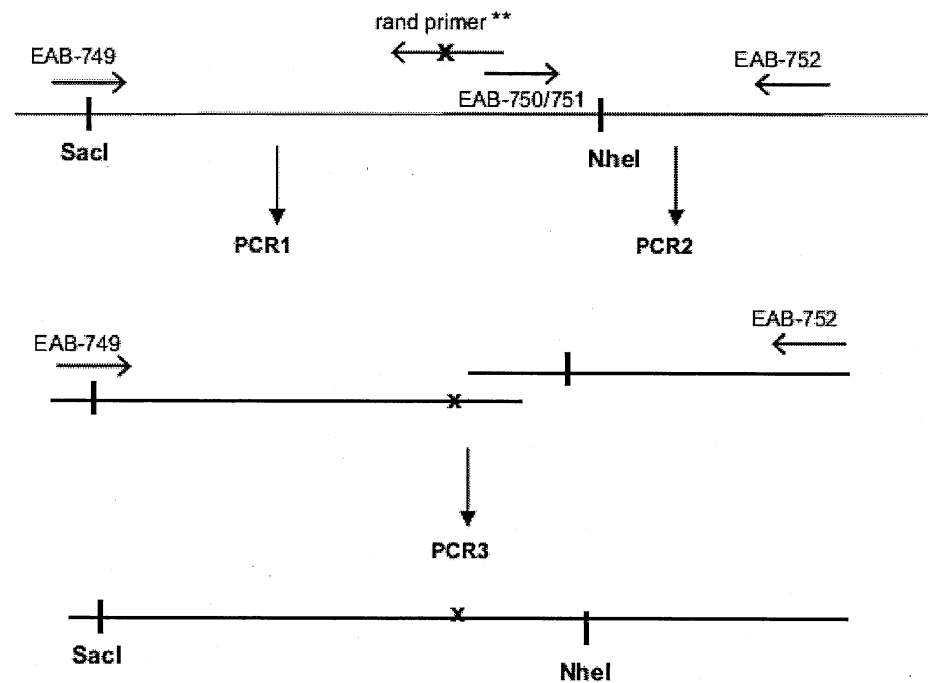
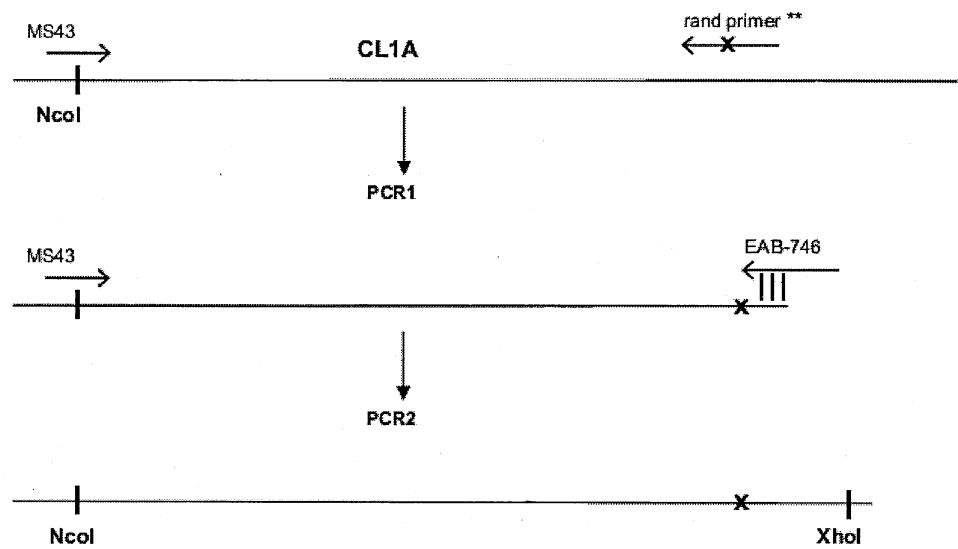


Fig. 12

CDR3 VH (CH7A) ngẫu nhiên**Fig. 13**

CDR3 VL (CL1A) ngẫu nhiên**Fig. 14**

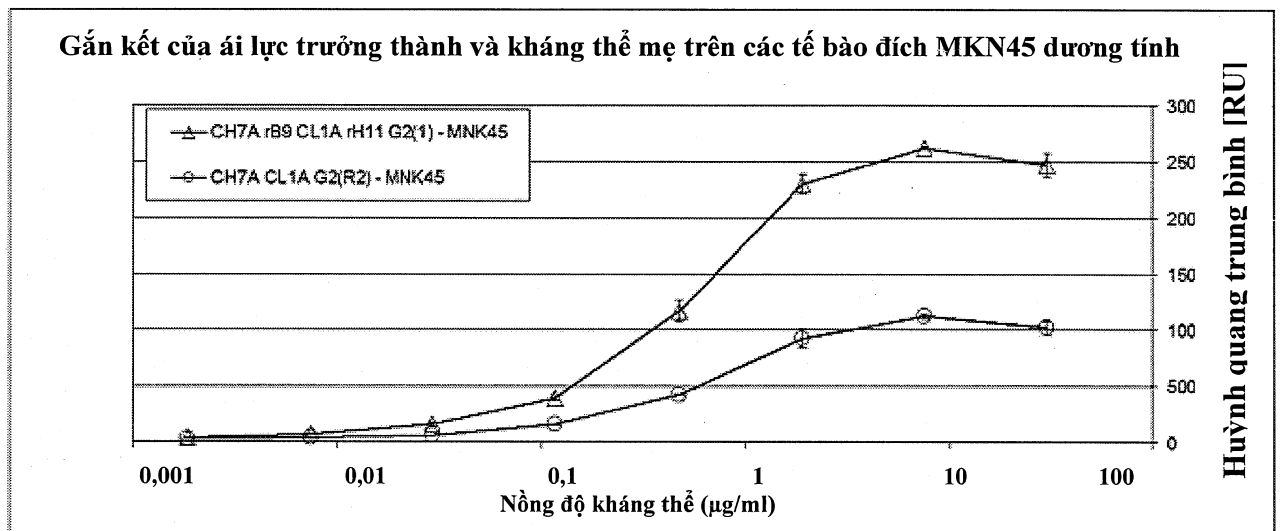
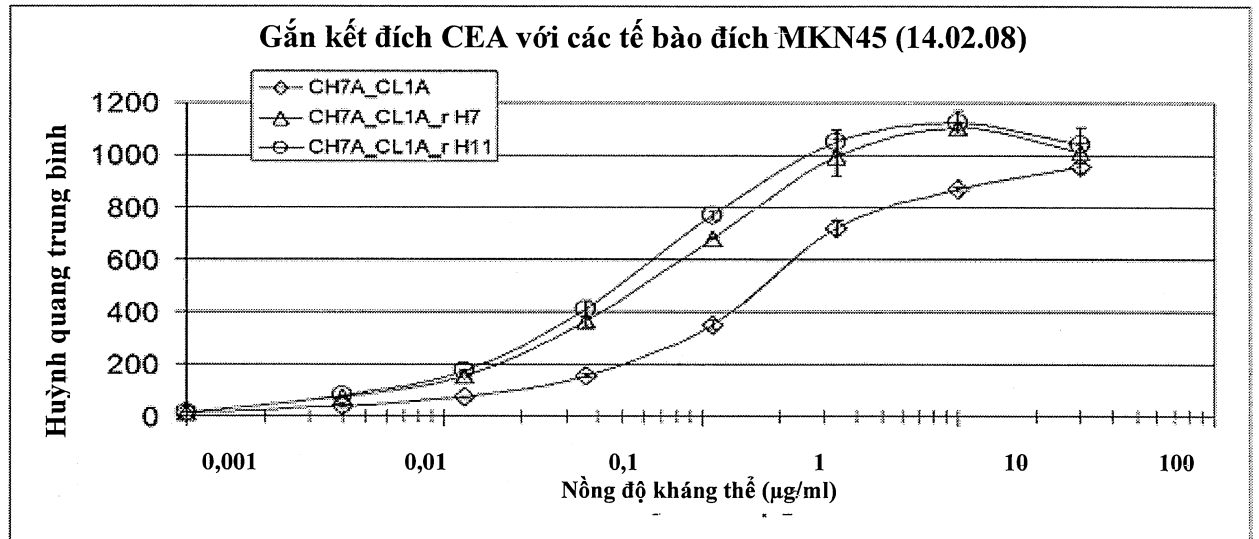


Fig. 15

Thử nghiệm ADCC in vitro của ái lực trưởng thành kháng CEA Abs khác nhau khi so sánh với kháng thể mẹ không trưởng thành

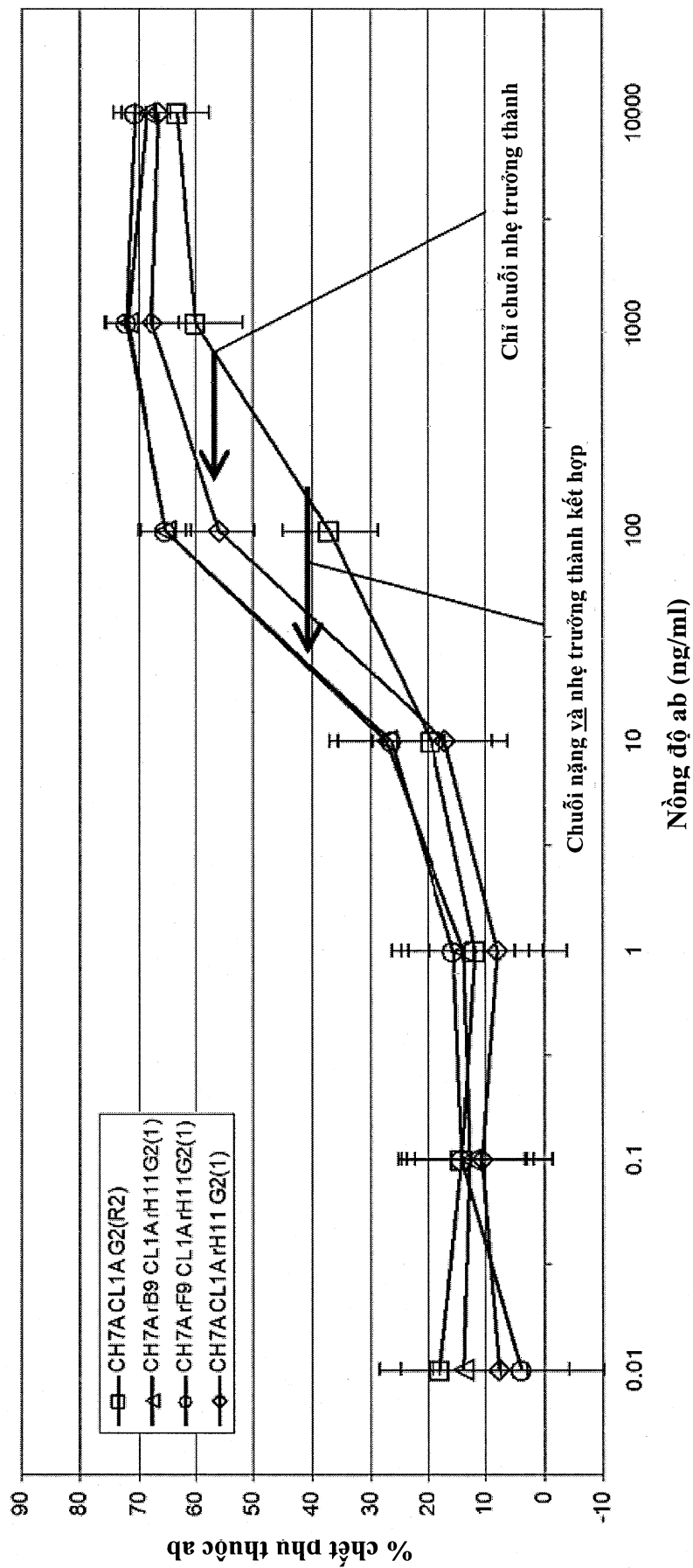


Fig. 16

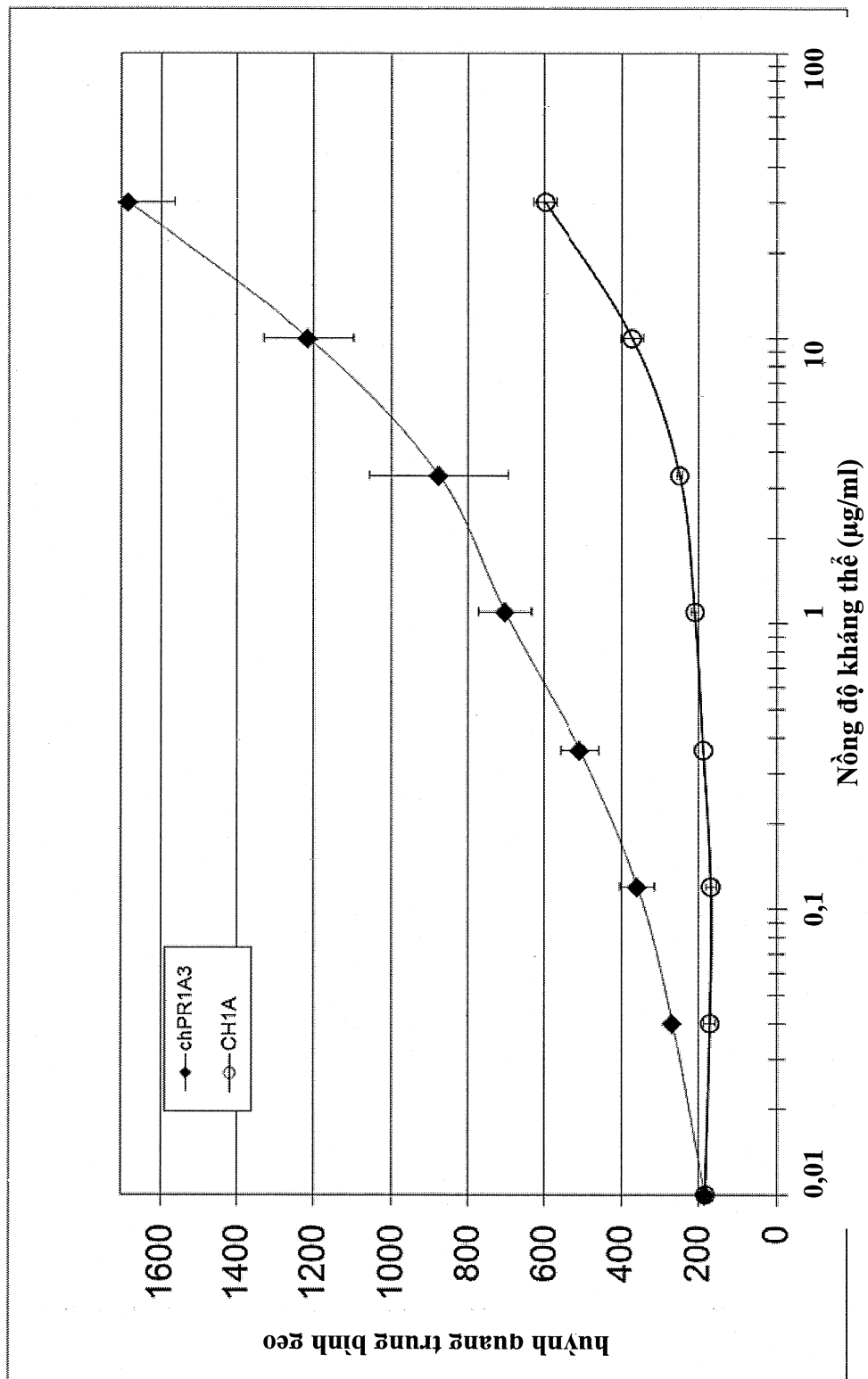


Fig. 17

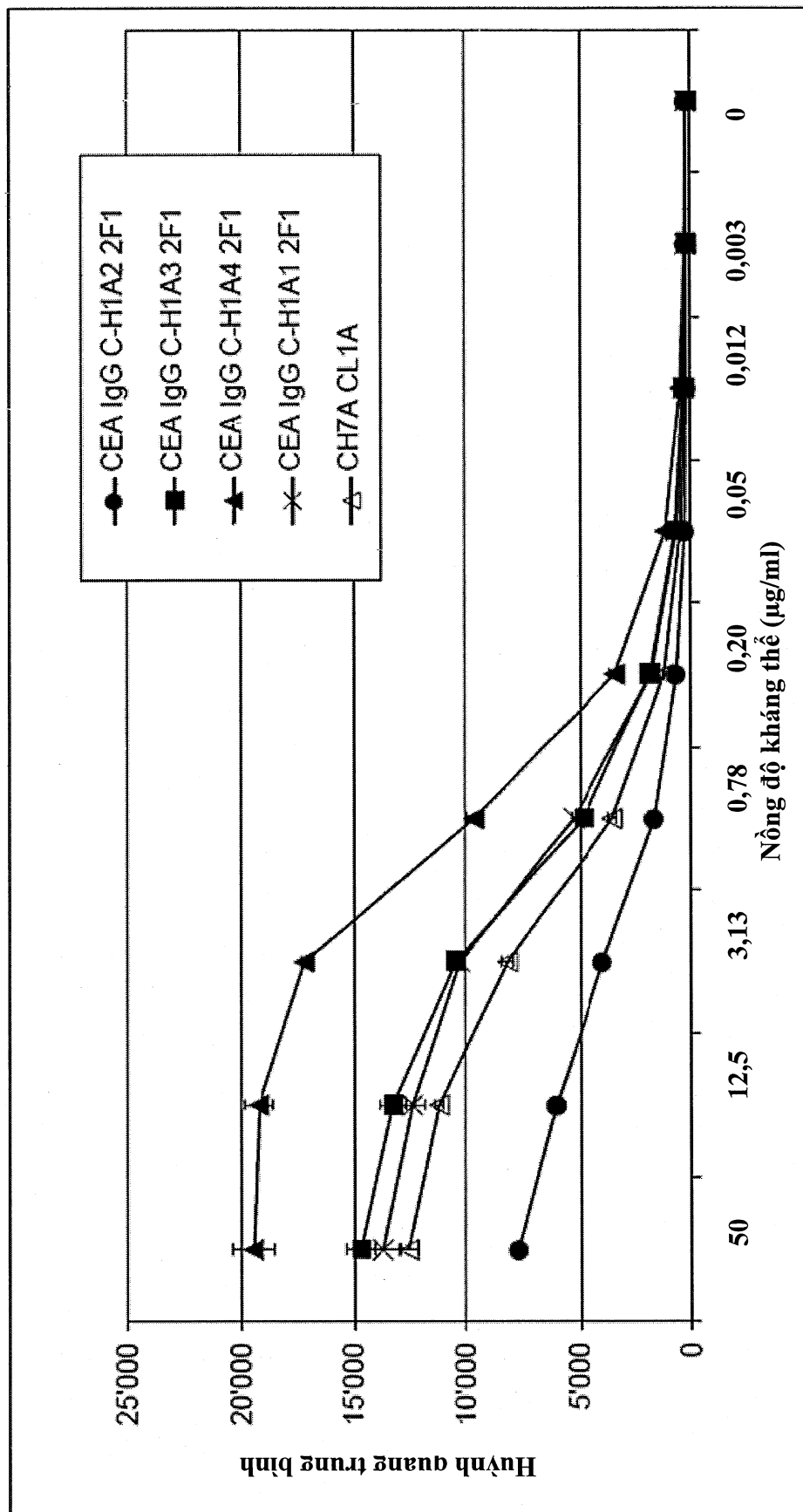


Fig. 18

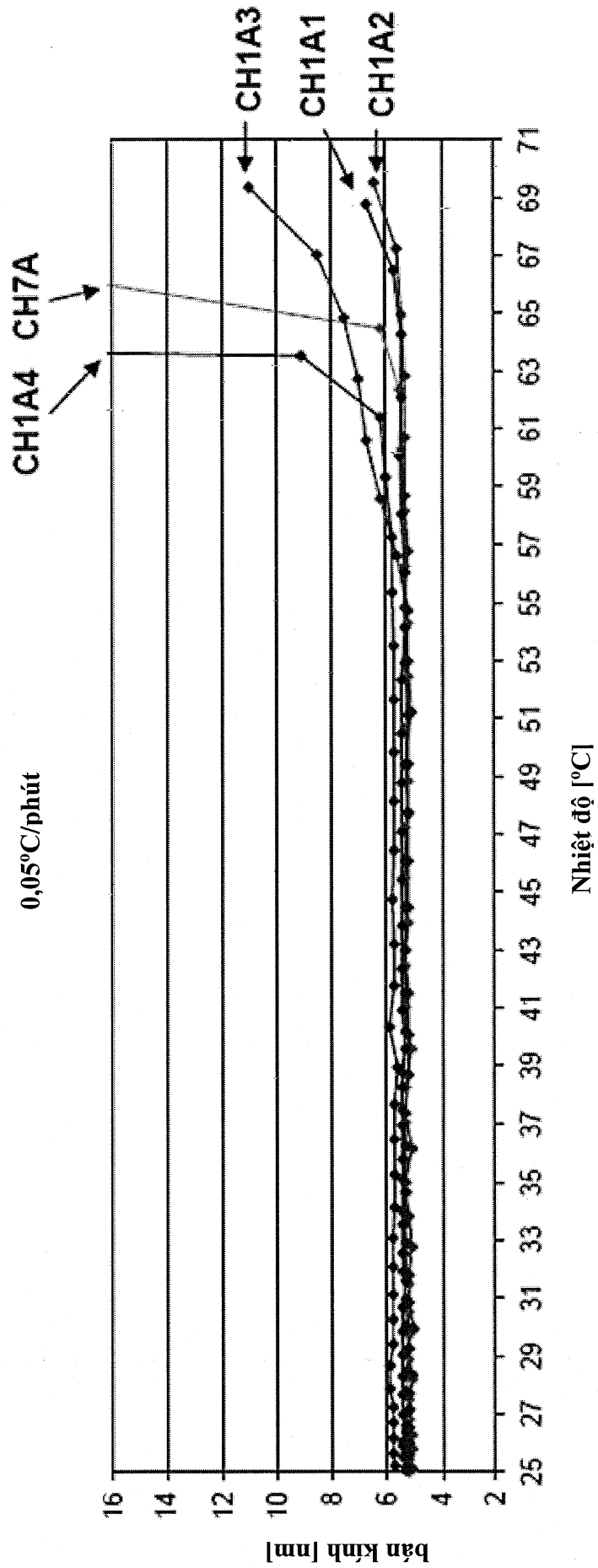
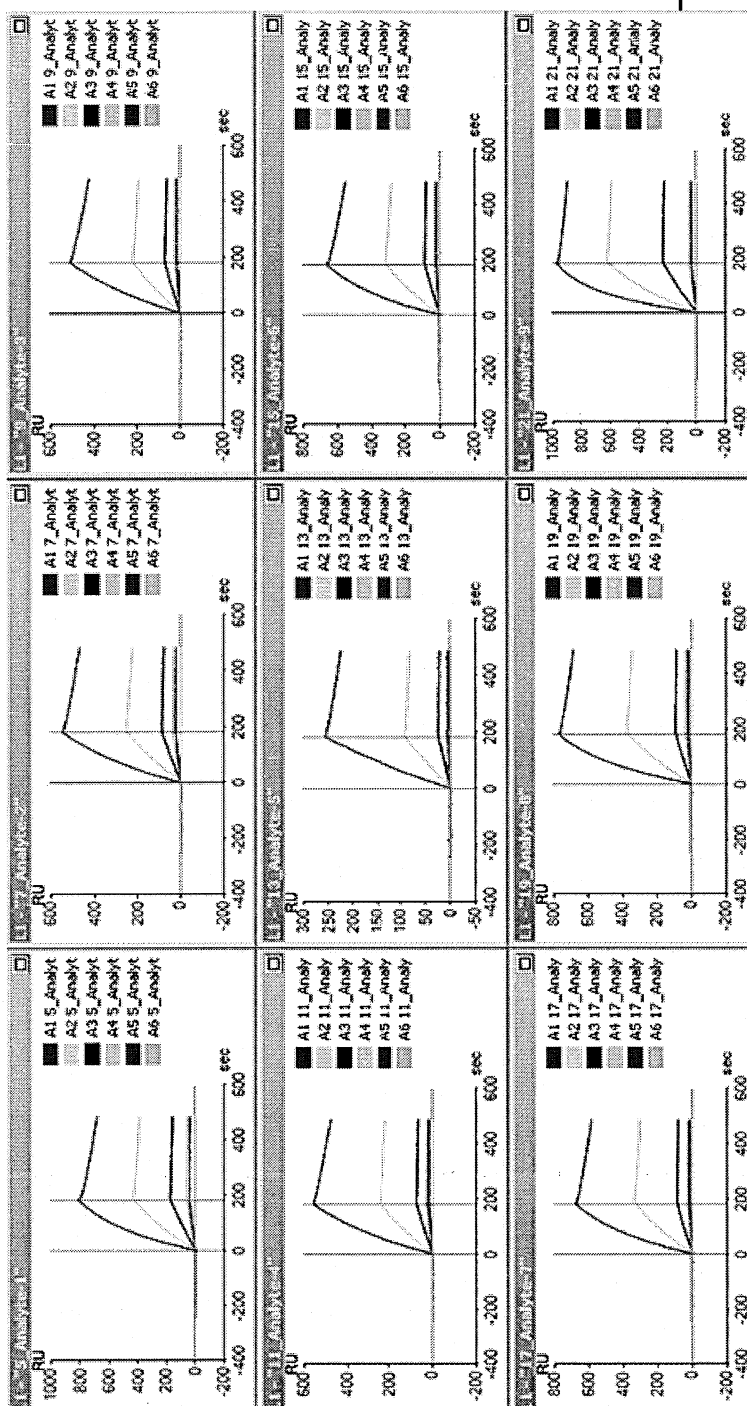


Fig. 19



	Cấu trúc	Assay ID	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH1A1D		11 Analyte 4	5.31×10^4	4.93×10^{-4}	9.28×10^{-9}
CH1A1E		13 Analyte 5	2.11×10^4	4.23×10^{-4}	2.00×10^{-8}
CH1A1F		15 Analyte 6	7.08×10^4	5.36×10^{-4}	7.58×10^{-9}
CH1A1G		17 Analyte 7	7.30×10^4	4.45×10^{-4}	6.10×10^{-9}
CH1A1		19 Analyte 8	8.19×10^4	3.47×10^{-4}	4.24×10^{-9}
CH7A		21 Analyte 9	1.22×10^5	2.24×10^{-4}	1.84×10^{-9}
CH1A1A		5 Analyte 1	8.18×10^4	4.83×10^{-4}	5.91×10^{-9}
CH1A1B		7 Analyte 2	5.37×10^4	4.78×10^{-4}	8.90×10^{-9}
CH1A1C		9 Analyte 3	4.49×10^4	5.84×10^{-4}	1.30×10^{-8}

Fig. 20

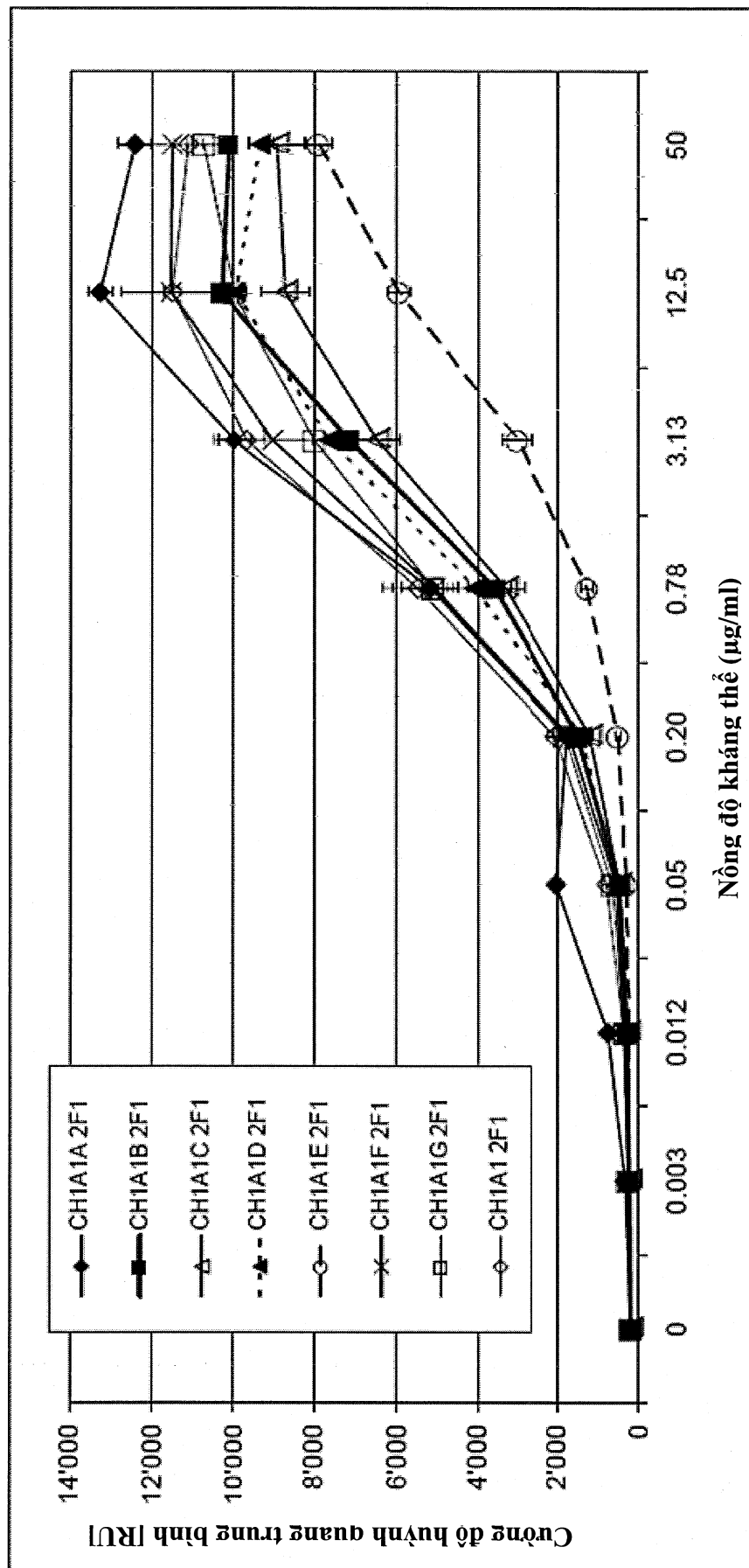


Fig. 21

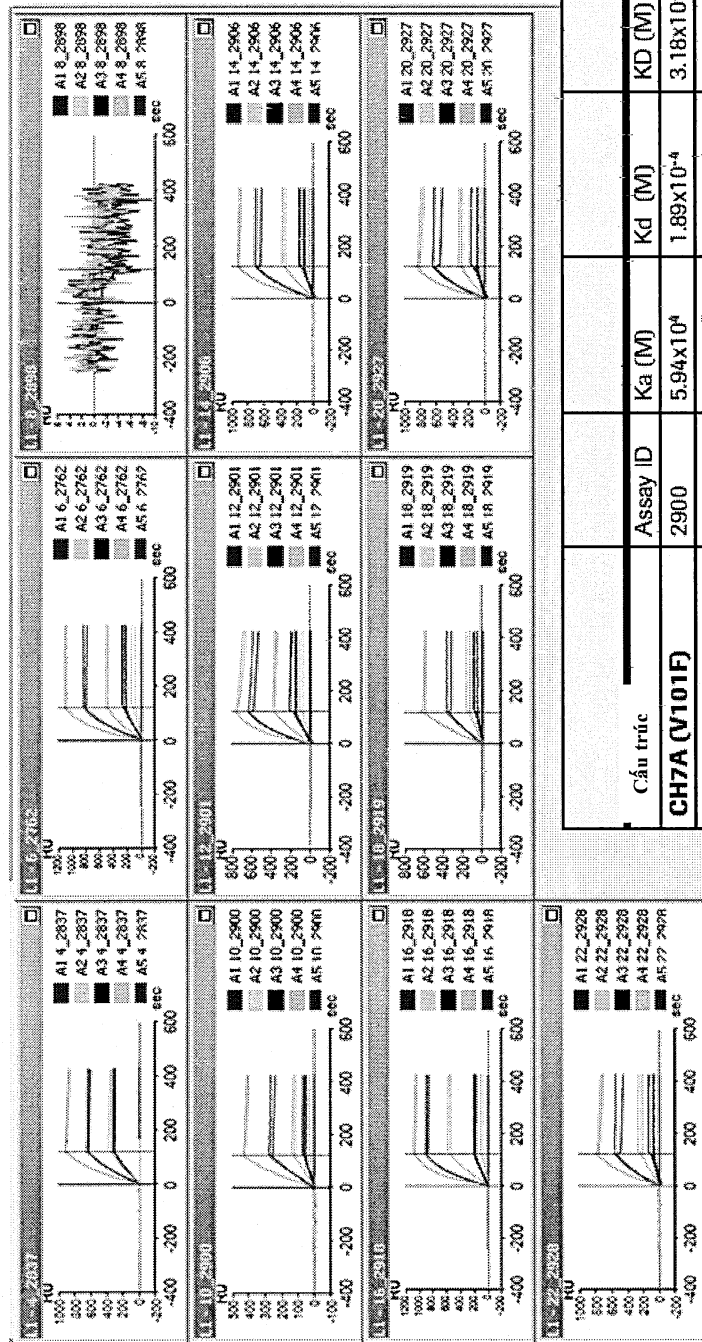


Fig. 22

Cầu trúc	Assay ID	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH7A (V101F)	2900	5.94×10^4	1.89×10^{-4}	3.18×10^{-9}
CH7A (E102Q)	2901	1.98×10^5	3.24×10^{-4}	1.63×10^{-9}
CH7A (Y98A)	2906	1.32×10^5	6.86×10^{-5}	5.20×10^{-10}
CH7A (Y98A/D99Y)	2918	2.36×10^5	4.40×10^{-5}	1.86×10^{-10}
CH7A (A103T)	2919	2.51×10^4	7.20×10^{-5}	2.87×10^{-9}
CH7A (D99Y)	2927	1.14×10^5	1.97×10^{-4}	1.73×10^{-9}
CH7A (D99H)	2928	8.65×10^4	1.95×10^{-4}	2.25×10^{-9}
CH7A CL1A 2F1	2837	1.32×10^5	1.41×10^{-4}	1.07×10^{-9}
5HFF12 2F1	2762	1.52×10^5	1.94×10^{-5}	1.28×10^{-10}
CH7A (W95Y)	2898	5.61×10^{-4}	109.73	1.95×10^5

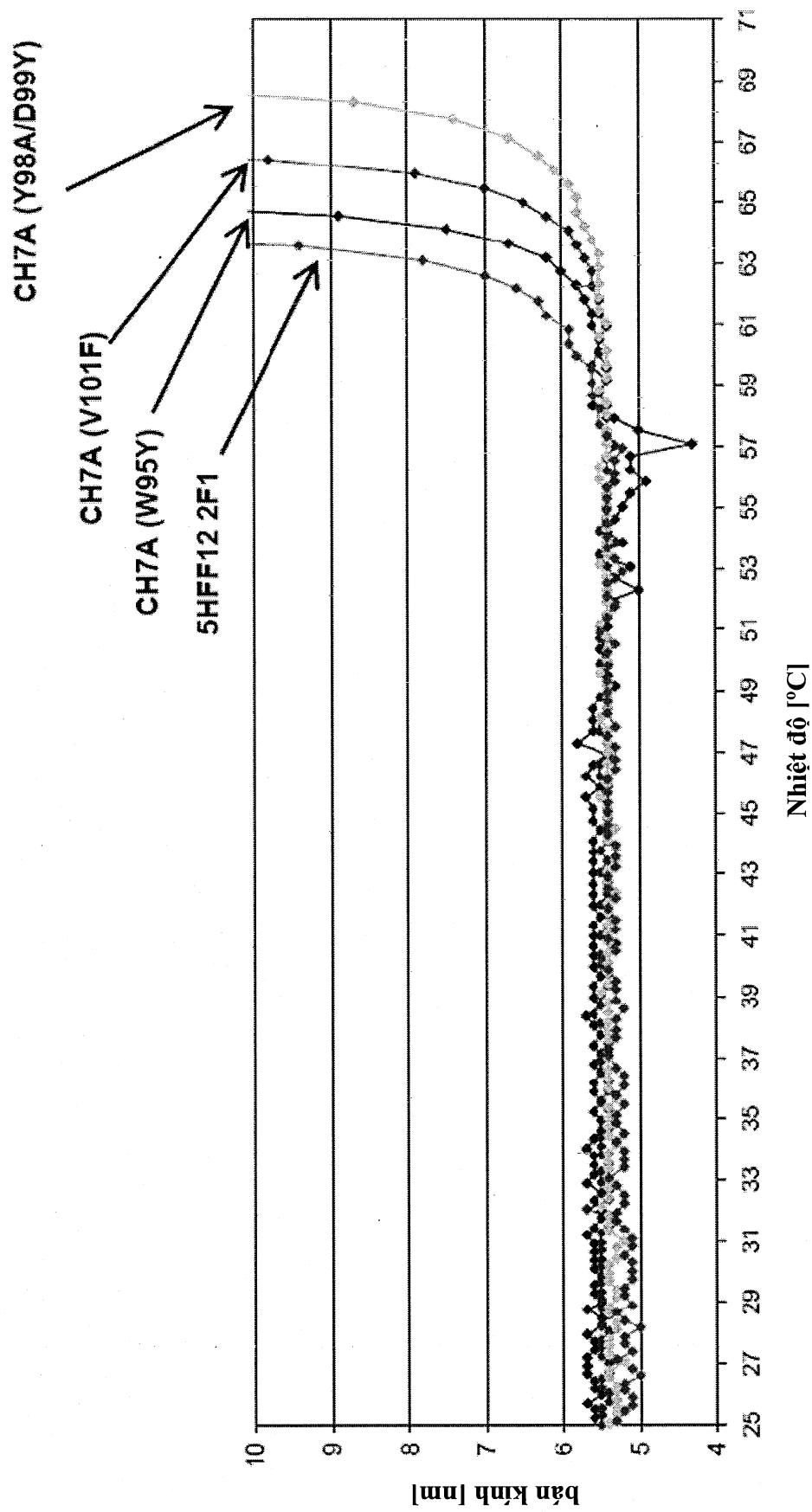


Fig. 23

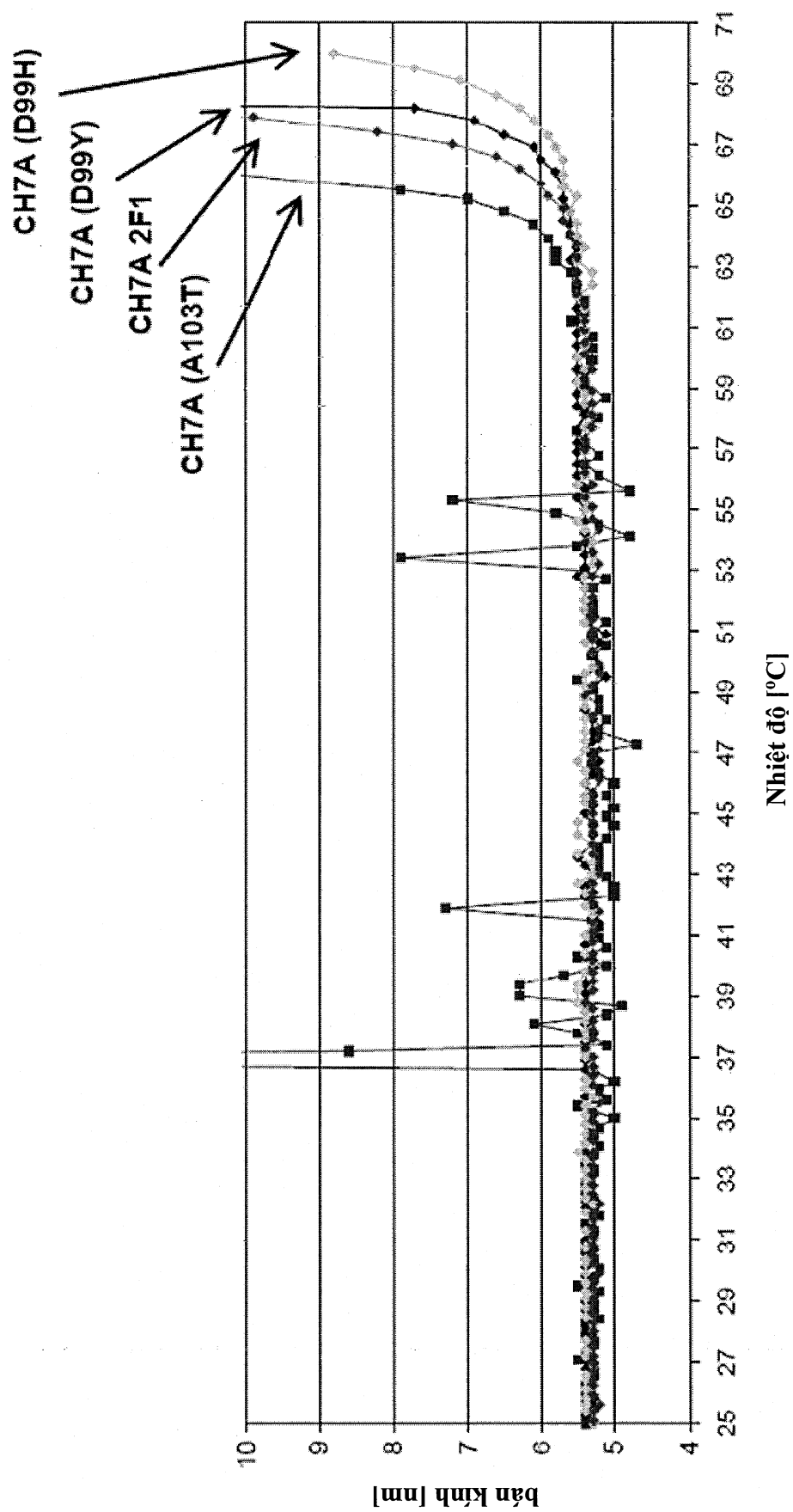
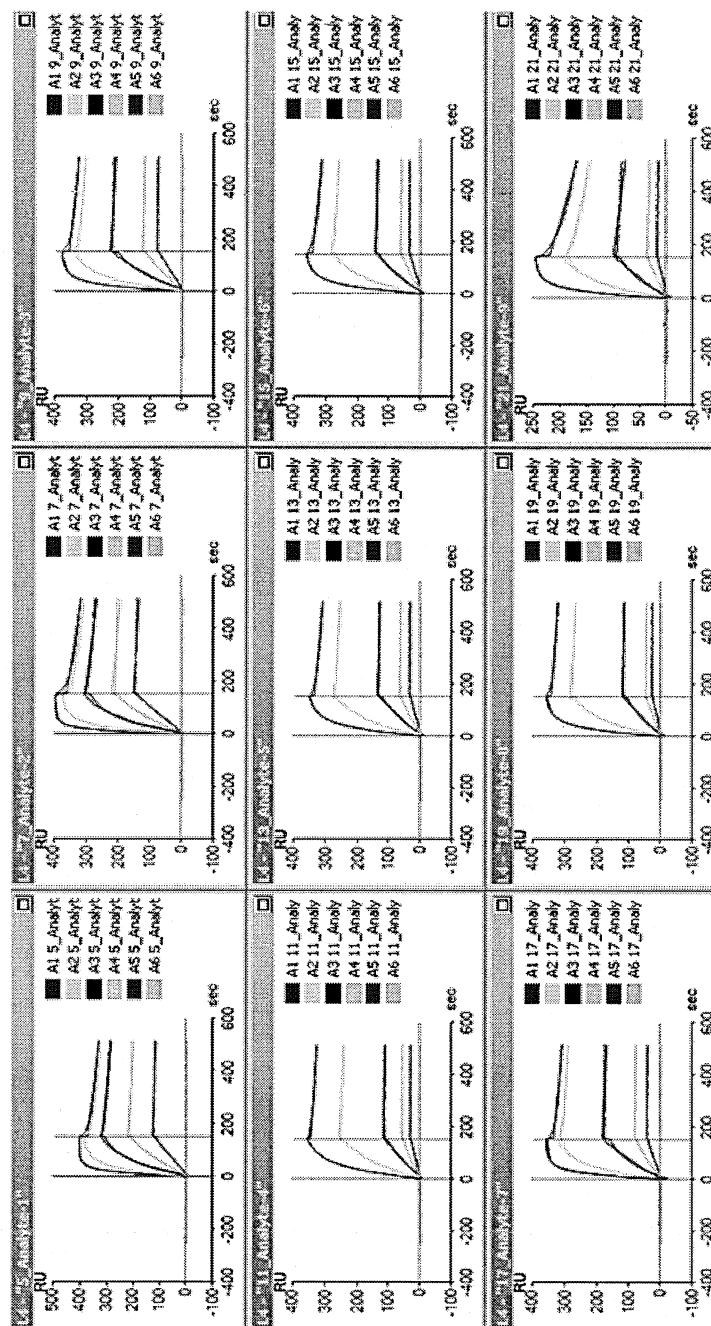


Fig. 24



Cấu trúc		Assay ID	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH7B 5L1A10 2F1	11 Analyte 4	2.21x10 ⁵	1.54x10 ⁻⁴	6.98x10 ⁻¹⁰	
	13 Analyte 5	2.80x10 ⁵	2.18x10 ⁻⁴	7.80x10 ⁻¹⁰	
	15 Analyte 6	3.30x10 ⁵	2.47x10 ⁻⁴	7.47x10 ⁻¹⁰	
	17 Analyte 7	4.81x10 ⁵	2.24x10 ⁻⁴	4.65x10 ⁻¹⁰	
	19 Analyte 8	3.36x10 ⁵	1.78x10 ⁻⁴	5.29x10 ⁻¹⁰	
	21 Analyte 9	3.69x10 ⁵	7.27x10 ⁻⁴	1.97x10 ⁻⁹	
	5 Analyte 1	6.28x10 ⁵	3.37x10 ⁻⁴	5.37x10 ⁻¹⁰	
	7 Analyte 2	7.11x10 ⁵	3.61x10 ⁻⁴	5.07x10 ⁻¹⁰	
	9 Analyte 3	4.19x10 ⁵	2.45x10 ⁻⁴	5.85x10 ⁻¹⁰	

Fig. 25

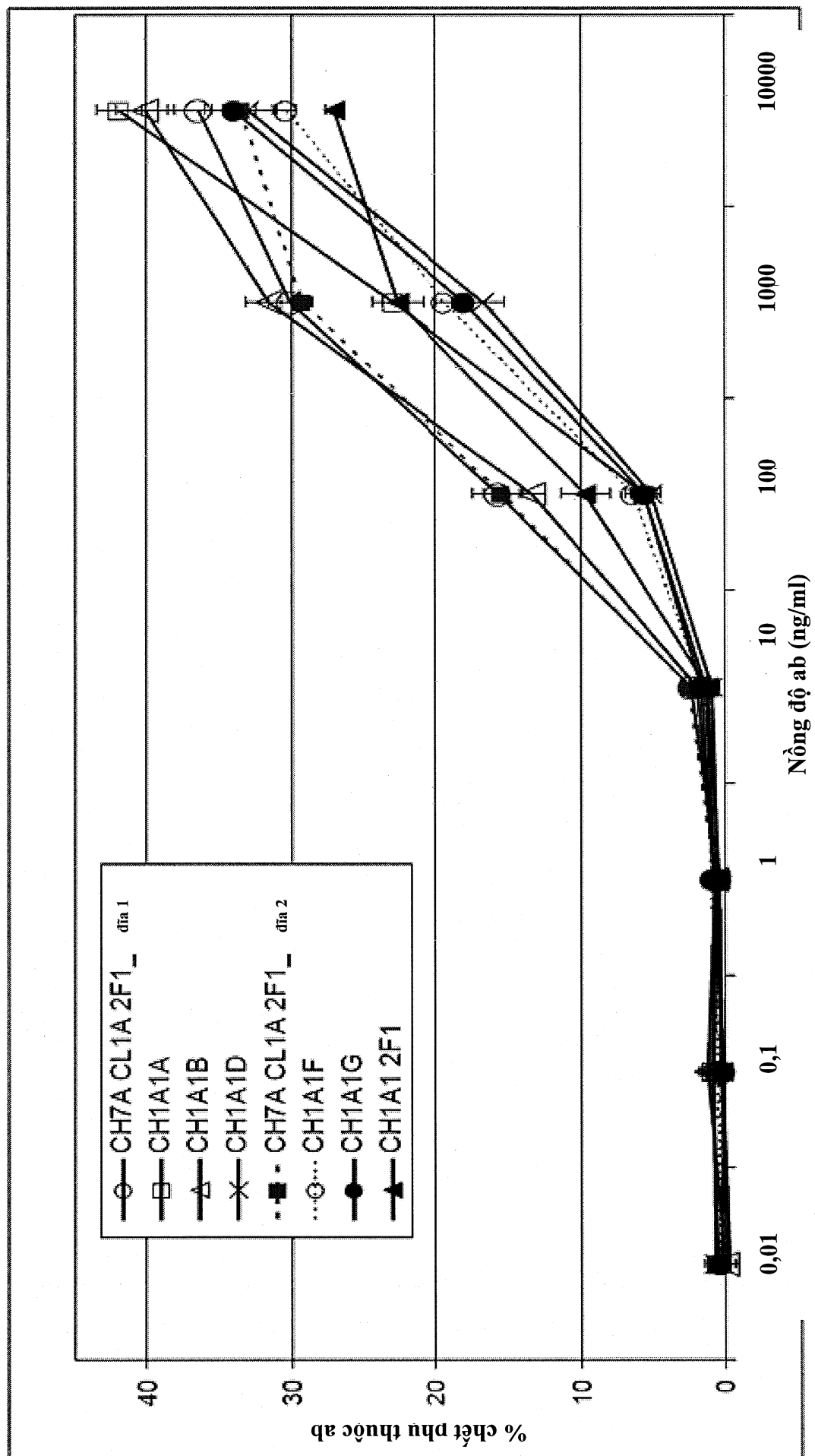


Fig. 26

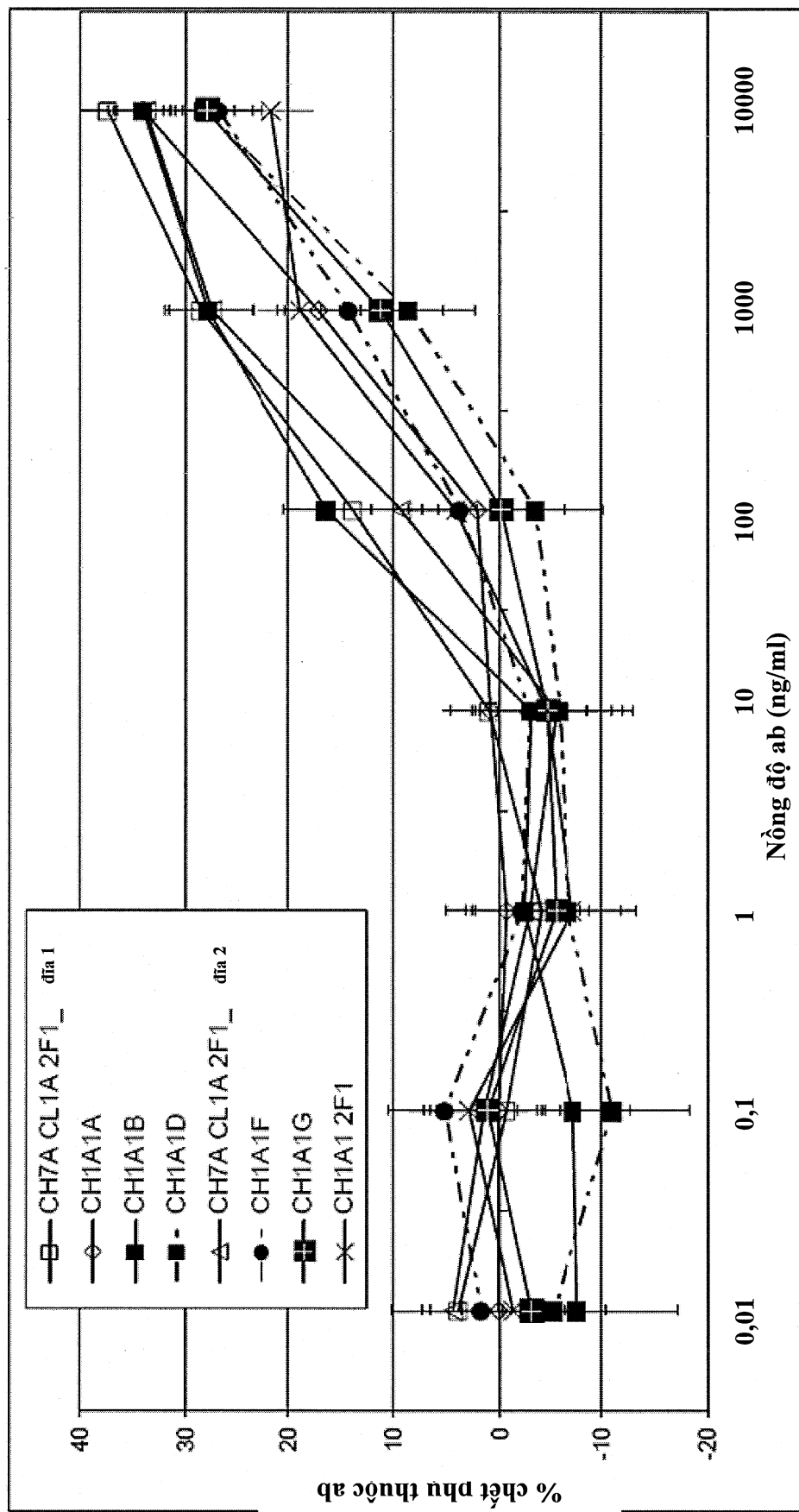


Fig. 27

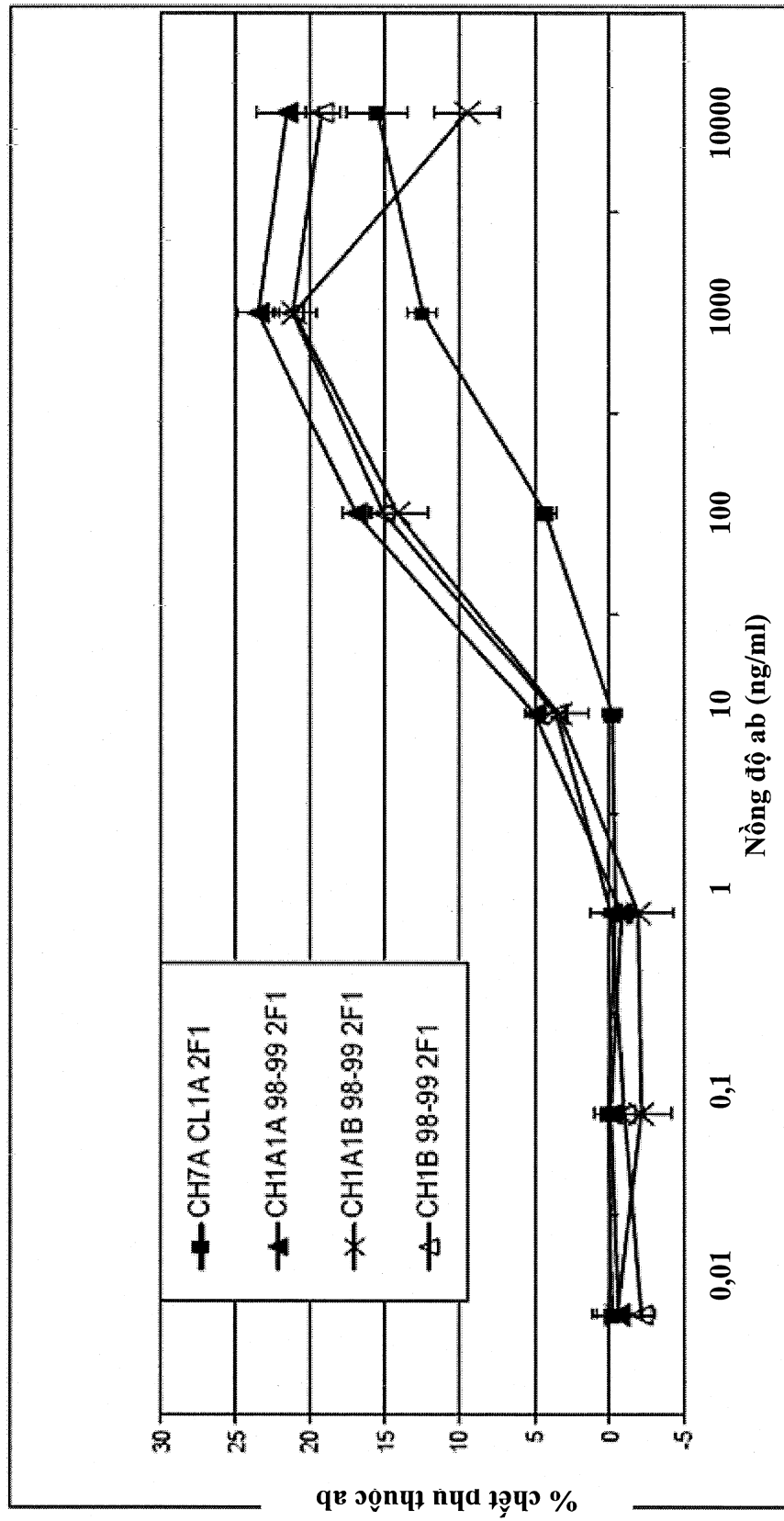


Fig. 28

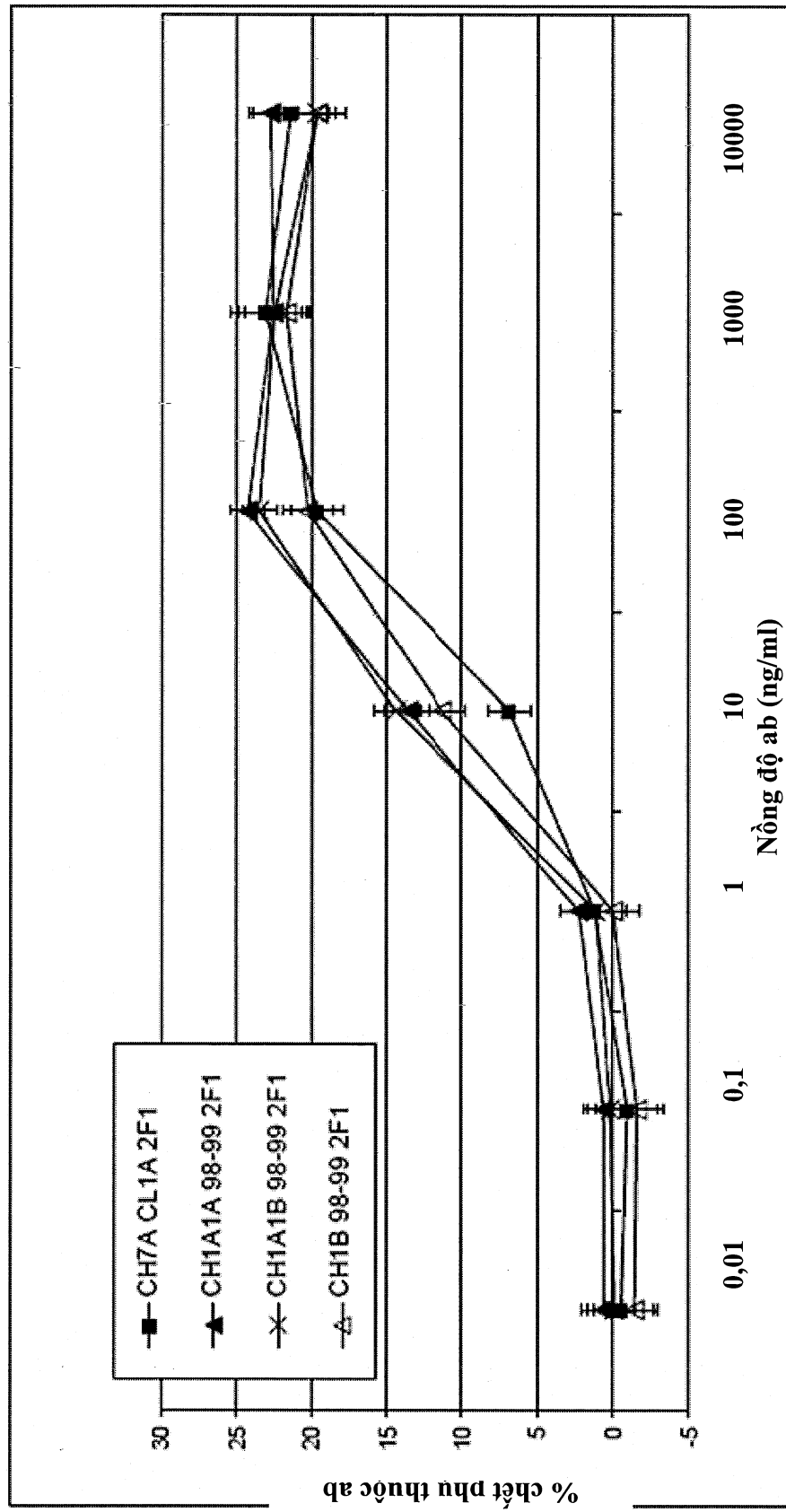


Fig. 29

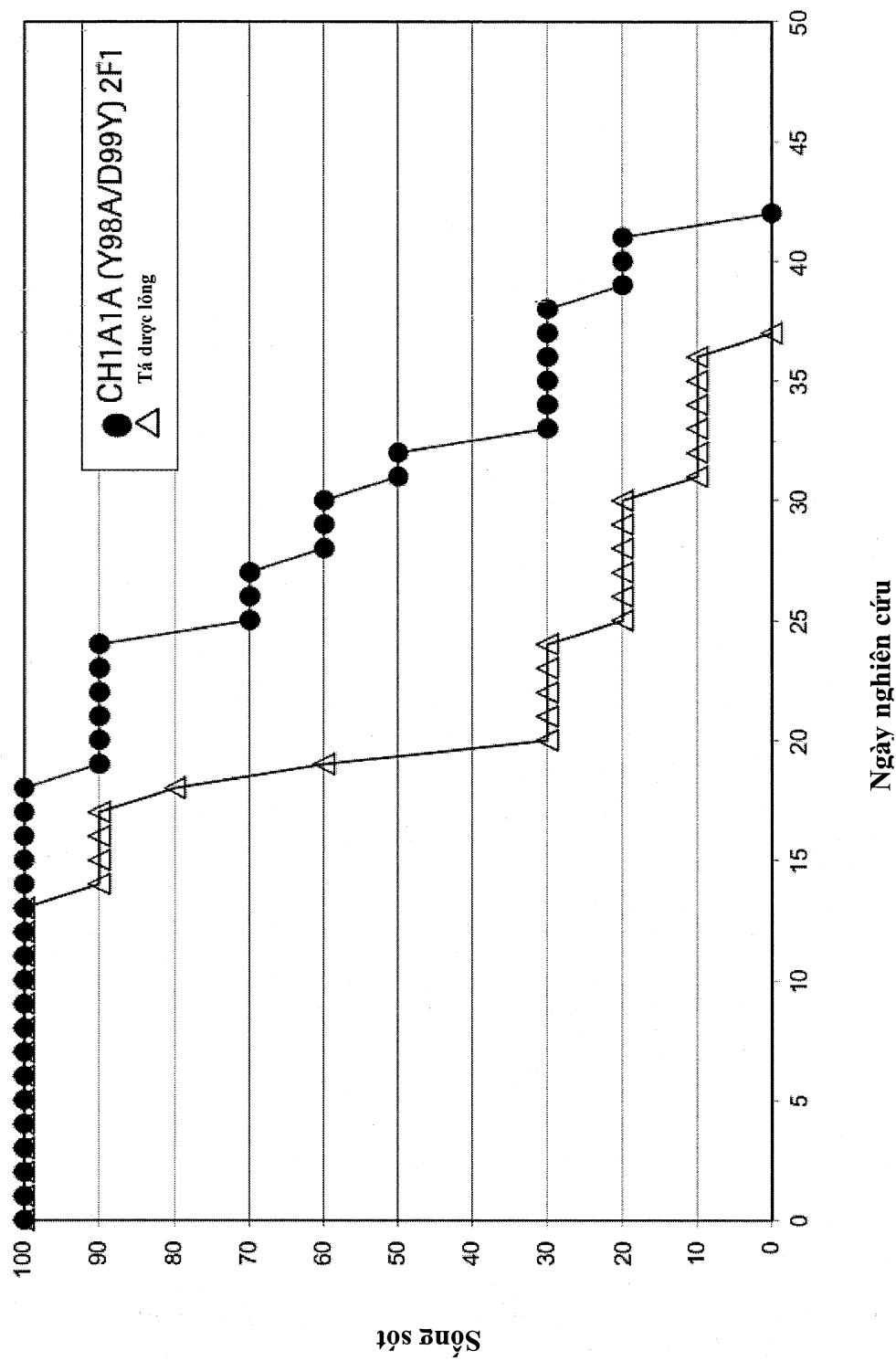


Fig. 30

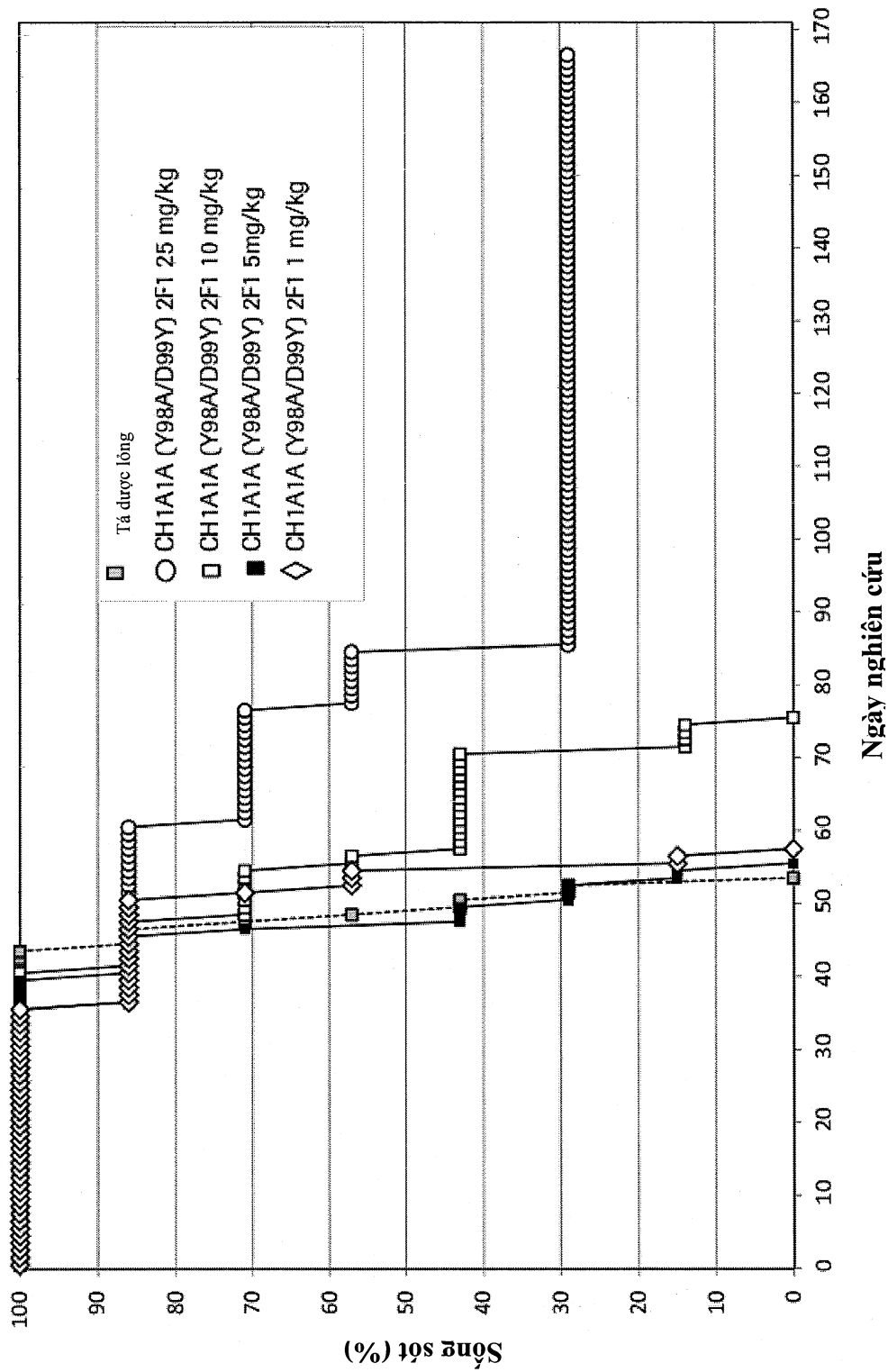


Fig. 31

CDR		Trình tự axit amin	SEQ ID NO
Chuỗi nặng CDR1	Kabat	EFGMN	1
		EYGMN	2
		EYSMN	3
	Chothia	EFGMS	5
		GYTFTEF	6
		GYTFTEY	7
	AbM	GYTFTEFGMN	8
		GYTFTEYGMN	9
		GYTFTEYSMN	10
		GYTFTEFGMS	12
Chuỗi nặng CDR2	Kabat	WINTKTGEATVVEEFG	13
		WINTKTGEATYIEEFG	14
		WINTKSGEATVVEEFG	15
	Chothia	YINTKNGEANVVEEFG	16
		WINTKNGEATYIEEFG	17
		NTKTGEAT	18
		NTKSGEAT	19
	AbM	NTKNGEAN	20
		WINTKTGEAT	21
		WINTKSGEAT	22
Chuỗi nặng CDR3	Kabat Chothia và AbM	YINTKNGEAN	23
		WINTKNGEAT	24
		WDFYDYVEAMDY	25
		WDFYHYVEAMDY	26
		WDFVDYVEAMDY	27
		WDFYWYVEAMDY	28
		WDAFEYVKALDY	29
		WDFFEYFKTMDY	30
		WDFFYVYVQTMDY	31
		WDFSYYVEAMDY	32
		WDFAHYFQTMDY	33
		WDFAYYFQTMDY	34
		WDFAYYLEAMDY	35

CDR	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
Chuỗi nhẹ CDR1	KASQNVGTNVA	36
	KASANVGNNVA	37
	KASKNVGTNVA	38
	KASAAVGTVA	39
	KASQYASTNVA	40
	KASHNVGTNVA	41
	KASQIMGPNVA	42
	KASQIVGTNVA	43
Chuỗi nhẹ CDR2	KASQKVLTNVA	44
	KASQTVSANVA	45
	SASYRYS	46
	YLASNLGG	47
	YLASYPQI	48
	YSASYRKR	49
	YWASYRYS	50
	YSASHRYS	51
Chuỗi nhẹ CDR3	YLASYHES	52
	YSASHRPS	53
	YLASYRYS	54
	YLASYRYR	55
	HQYYTYPLFT	56

Fig. 32

SEQ ID NO:	Cấu trúc chuỗi nhẹ	Trình tự axit amin
207	pAC21 (3A1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASANVGNVAVYQQKPGKAPKLLIYASNRSGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
208	pAC19 (2C6)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASKNVGTNVAVYQQKPGKAPKPLIYASYPQIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
209	pAC18 (2F1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAVGTNVAVYQQKPGKAPKLLIYASYSRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
210	pAC23 (2F11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQIASTNVAVYQQKPGKAPKLLIYWASYRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
211	H4E9 light chain	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGTNVAVYQQKPGKAPKPLIYASARYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
212	L2D2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASHNVGTNVAVYQQKPGKAPKLLIYASASHRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
213	pAC6 (C1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQIMGNVAVYQQKPGKAPKLLIYASYESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
214	pAC7 (E10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQIVGTNVAVYQQKPGKAPKLLIYASASHPRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
215	pAC12 (H7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQKVLTVAVYQQKPGKAPKLLIYASARYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
216	pAC13 (H11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQTVSANVAVYQQKPGKAPKLLIYASARYRGRVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT

Fig. 33

SEQ ID NO:	CDR-H3 (các gốc ngẫu nhiên là các gốc đã chọn được gạch dưới in đậm)	Ái lực (được xác định bởi Biacore)	Cấu trúc
25	WDFYDYVEAMDY	3681 nM	PMS22
26	WDFYHYVEAMDY	586 nM	1C8
27	WDFVDYVEAMDY	1893 nM	3E1
28	WDFYWYVEAMDY	746 nM	2D7
33	WDFAHYFQTM DY	59 nM	Ái lực trưởng thành CDRH-3
34	WDFAYYFQTM D	44 nM	Ái lực trưởng thành CDRH-3
35	WDFAYYLEAMD	69 nM	Ái lực trưởng thành CDRH-3
29	WDAFEYVKALDY	26 nM	H3 Full (5) 19
30	WDFFEYFKTMDY	51 nM	H3 Full (5) 8
31	WDFFFYYVQTM DY	81 nM	H3 Full (5) 28
33	WDFSYYVEAMDY	132 nM	H3 Full (5) 27
CDR-H1 và CDR-H2			
1 và 13	EFGMN và WINTKTGEATYVEEFKG	3681 nM	pMS22
1 và 14	EFGMN và WINTKTGEATYIEEFKG	402 nM	H4E9
1 và 15	EFGMN và WINTKSGEATYVEEFKG		pAC14 (B9)
2 và 15	EYGMN và WINTKSGEATYVEEFKG		pAC15 (F9)
3 và 16	EYSMN và YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 2

Fig. 34A

SEQ ID NO:	CDR-H3 (các gốc ngẫu nhiên là các gốc đã chọn được gạch dưới in đậm)	Ái lực (được xác định bởi Biacore)	Cấu trúc
2 and 17	EYGMN and WINTKNGEATYIEEFKG		H1/H2 (5) 11
1 and 16	EFGMN and YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 13
2 and 16	EYGMN and YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 14
5 and 13	EFGMS and WINTKTGEATYVEEFKG	26 nM	H3 Full (5) 19
	CDR-L1 and CDR-L2		
36 and 46	QNVGTN and <u>YSASYRYS</u>	3681 nM	pMS22
37 and 47	ANVGNN and YLASNLSG	250 nM	pAC21 (3A1)
38 and 48	KNVGTN and YLASYPQI	700 nM	pAC19 (2C6)
39 and 49	AAVGTY and YSASYRKR	220 nM	pAC18 (2F1)
40 and 50	QYASTN and YWASYRYS	290 nM	pAC23 (2F11)
36 and —	QNVGTN and PLI -YSASYRYS	402 nM	H4E9
41 and 51	HNVGTN and YSASHRYS	2255 nM	L2D2
42 and 52	QIMGPN and YLASYHES		pAC6 (C1)
43 and 53	QIVGTN and YSASHRPS		pAC7 (E10)
44 and 54	QKVLTN and YLASYRYS		pAC12 (H7)
45 and 55	QTVSAN and YLASYRYR		pAC13 (H11)
	CDR-L3		
56	HQYYTYPLT		pMS22

Fig. 34B

Tên dòng vô tính	Chuối	Ái lực đơn trị	Ái lực có hóa trị hai
PR1A3	wf/wt	$k_{on}: 6.74 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.48 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 3681 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 2.82 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 5.52 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 2 \times 10^{-9} \text{M}$
1C8	hc/wt	$k_{on}: 12.9 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.76 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 586 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 4.67 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 3.24 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.693 \times 10^{-9} \text{M}$
H4E9	hc/wt	$k_{on}: 5.22 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.21 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 402 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 2.92 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.04 \times 10^{-3} \text{ 1/s};$ $KD: 0.7 \times 10^{-9} \text{M}$
H3 Full (5) 19	hc/wt	$k_{on}: 54.2 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.13 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 24 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 9.02 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 1.75 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.19 \times 10^{-9} \text{M}$
H3 Full (5) 8	hc/wt	$k_{on}: 27.3 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.14 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 51 \times 10^{-9} \text{M}$	N/D
3A1	wf/lc	$k_{on}: 46.8 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 1.17 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 250 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 2.42 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 3.64 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 1.5 \times 10^{-9} \text{M}$
2F1	wf/lc	$k_{on}: 95.7 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.07 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 220 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 4.23 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 4.10 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.952 \times 10^{-9} \text{M}$
5L1A10	hc/wt	$k_{on}: 15.6 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.09 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 59 \times 10^{-9} \text{M}$	N/D
5HFF12	hc/wt	$k_{on}: 20.8 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.09 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 44 \times 10^{-9} \text{M}$	N/D
M4F1	hc/wt	$k_{on}: 25.7 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.17 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 69 \times 10^{-9} \text{M}$	N/D
H4E9 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 36.4 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.35 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 96 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 4.23 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 1.91 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.452 \times 10^{-9} \text{M}$
H4E9 x 3A1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 2.46 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 1.36 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.55 \times 10^{-9} \text{M}$
1C8 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 68.1 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.87 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD \ 128 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 9.68 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 6.36 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.66 \times 10^{-9} \text{M}$
1C8 x 3A1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 2.89 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.57 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.888 \times 10^{-9} \text{M}$
H3 Full (5) 19 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 206 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.25 \times 10^{-2} \text{ 1/s}; KD: 12.2 \times 10^{-9} \text{M}$	$k_{on}: 1.76 \times 10^6 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.84 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.16 \times 10^{-9} \text{M}$
H3 Full (5) 8 x 2F1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 9.93 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.71 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ $KD: 0.28 \times 10^{-9} \text{M}$

Fig. 35

SEQ ID NO:	Cấu trúc CDR-H3	Trình tự axit amin
25	PR1A3 CDR-H3	WDFYDYVEAMDY
33	5HFF12 CDR-H3	WDF A HY F QTMDY
34	5L1A10 CDR-H3	WDF A YY F QTMDY
217	PR1A3 (Y98A)	WDF A DYVEAMDY
218	PR1A3 (D99Y)	WDFYYVEAMDY
219	PR1A3 (D99H)	WDFY H YVEAMDY
220	PR1A3 (V101F)	WDFYDY F EAMDY
221	PR1A3 (E101aQ)	WDFYDY V QAMDY
222	PR1A3 (A103T)	WDFYDY V ETMDY
223	PR1A3 (Y98A / D99Y)	WDF A YYVEAMDY
224	PR1A3 (W95Y)	YDFYDYVEAMDY

Fig. 36

SEQ. ID NO:	Cấu trúc chuỗi nặng	Trình tự axit amin
225	CH7A (Y98A)	QVQLVQSGSELKPPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARWDFADYYEAMDYWGQGTITVTVSS
226	CH7A (D99Y)	QVQLVQSGSELKPPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARWDFYVVEAMDYWGQGTITVTVSS
227	CH7A (D99H)	QVQLVQSGSELKPPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTITVTVSS
228	CH7A (V101F)	QVQLVQSGSELKPPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARWDFDYFEAMDYWGQGTITVTVSS
229	CH7A (E102Q)	QVQLVQSGSELKPPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARWDFDYVQAMDYWGQGTITVTVSS
230	CH7A (A103T)	QVQLVQSGSELKPPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARWDFDYVETMDYWGQGTITVTVSS
231	CH7A (Y98A / D99Y)	QVQLVQSGSELKPPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSS
232	CH7A (W95Y)	QVQLVQSGSELKPPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARYDFYDYVEAMDYWGQGTITVTVSS
233	CH1A1A (Y98A)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFADYYEAMDYWGQGTITVTVSS
234	CH1A1A (D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYVVEAMDYWGQGTITVTVSS

Fig. 37A

SEQ. ID NO:	Cấu trúc chuỗi nặng	Trình tự axit amin
235	CH1A1A (D99H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFYHYEAMDYWGQGTTVTVSS
236	CH1A1A (V101F)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTTVTVSS
237	CH1A1A (E102Q)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFYDYQAMDYWGQGTTVTVSS
238	CH1A1A (A103T)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVETMDYWGQGTTVTVSS
239	CH1A1A (Y98A / D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFAYYYEAMDYWGQGTTVTVSS
240	CH1A1B (W95Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARYDFDYVEAMDYWGQGTTVTVSS
241	CH1A1B (Y98A)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTTVTVSS
242	CH1A1B (D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTTVTVSS
243	CH1A1B (D99H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTTVTVSS
244	CH1A1B (V101F)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTTVTVSS

Fig. 37B

SEQ. ID NO.:	Cấu trúc chuỗi năng	Trình tự axit amin
245	CH1A1B (E102Q)	QVKLQSSGAENVKPGASVKVSKASGYTFTTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVQAMDYWGQGTTTVTVSS
246	CH1A1B (A103T)	QVKLQSSGAENVKPGASVKVSKASGYTFTTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVETMDYWGQGTTTVTVSS
247	CH1A1B (Y98A / D99Y)	QVKLQSSGAENVKPGASVKVSKASGYTFTTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTTVTVSS
248	CH1A1B (W95Y)	QVKLQSSGAENVKPGASVKVSKASGYTFTTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYDFDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS
261	CH1A1A	QVQLVQSSGAENVKPGASVKVSKASGYTFTTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS
262	CH1A1B	QVKLQSSGAENVKPGASVKVSKASGYTFTTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS
263	CH1A1C	QVQLVQSGPELKKPGASVKVSKASGYTFTTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS

Fig. 37C

Fig. 38