



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

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

(11)



1-0024713

(51)⁷ C12N 15/09; A61K 39/395; A61P 35/00; (13) B
C07K 16/28; C12N 1/15; C12P 21/08;
C12N 1/21; C12N 15/02; C12N 5/10;
C12P 21/02; A61K 38/00; C12N 1/19

(21) 1-2013-03617

(22) 24/04/2012

(86) PCT/JP2012/060904 24/04/2012

(87) WO2012/147713A1 01/11/2012

(30) 61/478,878 25/04/2011 US; 2011-097645 25/04/2011 JP

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/02/2014 311A

(73) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)

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

(72) TAKAHASHI, Shu (JP); MATSUOKA, Tatsuji (JP); MURAKAMI, Kenji (JP);
TAKIZAWA, Takeshi (JP); HIROTANI, Kenji (JP); URANO, Atsushi (JP);
FUKUCHI, Keisuke (JP); YAZAWA, Mitsuhiro (JP).

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

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG B7-H3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể có tác dụng điều trị khối u. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến kháng thể mà liên kết với B7-H3 thể hiện hoạt tính chống ung thư.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm để điều trị khối u.

Bằng cách thu được kháng thể kháng B7-H3 mà liên kết với B7-H3 thể hiện hoạt tính chống ung thư, có thể thu được dược phẩm để điều trị khối u chứa kháng thể này và các chất tương tự.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với B7-H3 và hữu ích dùng làm tác nhân điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh ung thư, và sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh ung thư sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

B7-H3 là protein có cấu trúc một vùng chuyển màng (tài liệu phi sáng chế 1). Vùng ngoại bào đầu tận cùng N của B7-H3 chứa hai biến thể. Biến thể 1 lần lượt chứa vùng Ig giống V và giống C, ở một trong hai vị trí, và biến thể 2 lần lượt chứa vùng Ig giống V và giống C, ở một vị trí. Vùng nội bào đầu tận cùng C của B7-H3 chứa 45 axit amin.

Dùng làm thụ thể cho B7-H3, TLT-2 có cấu trúc một vùng chuyển màng đã được báo cáo (tài liệu phi sáng chế 2). Tuy nhiên, cũng có báo cáo khẳng định rằng TLT-2 không phải là thụ thể đối với B7-H3 (tài liệu phi sáng chế 3). Theo báo cáo trước đó, sự hoạt hóa các tế bào T dương tính với CD8 được tăng cường khi thụ thể này được liên kết với B7-H3.

Đã có báo cáo lâm sàng rằng B7-H3 được biểu hiện quá mức trong nhiều loại ung thư, cụ thể là trong ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư thận, canxinom đường tiết niệu, ung thư kết trực tràng, ung thư tiền liệt tuyến, u tế bào thần kinh đệm đa dạng, ung thư buồng trứng, và ung thư tụy (các tài liệu phi sáng chế 4 đến 11). Ngoài ra, đã được báo cáo rằng trong bệnh ung thư tiền liệt tuyến, mức độ biểu hiện của B7-H3 liên quan mật thiết đến mức độ ác tính của bệnh học lâm sàng như thể tích khối u, khả năng xâm nhập ngoài tuyến tiền liệt, hoặc điểm Gleason, và cũng liên quan đến sự tiến triển của bệnh ung thư (tài liệu phi sáng chế 8). Tương tự, trong u tế bào thần kinh đệm đa dạng, sự biểu hiện của B7-H3 liên quan bất lợi đến sự sống sót của tế bào (tài liệu phi sáng chế 9), và trong bệnh ung thư tụy, sự biểu hiện của B7-H3 liên quan đến sự di căn của hạch bạch huyết và sự tiến triển của bệnh lý (tài liệu phi sáng chế 11). Trong bệnh ung thư buồng trứng, sự biểu hiện của B7-H3 liên quan đến sự di căn của hạch bạch huyết và sự tiến triển của bệnh.

Hơn nữa, đã được báo cáo rằng bằng cách đưa siRNA kháng gen B7-H3 vào trong dòng tế bào ung thư dương tính với B7-H3, sự kết dính với fibronectin giảm đi, do đó làm giảm sự di cư tế bào và sự xâm lấn Matrigel (tài liệu phi sáng chế 12).

Ngoài ra, đã được báo cáo rằng trong u tế bào thần kinh đệm đa dạng, sự biểu hiện của B7-H3 cho phép tránh khỏi sự chết tế bào do tế bào NK gây ra (tài liệu phi sáng chế 13).

Mặt khác, B7-H3 đã được báo cáo là được biểu hiện không chỉ trong các tế bào ung thư, mà còn trong khối u hoặc mạch xung quanh (các tài liệu phi sáng chế 5 và 14). Đã được báo cáo rằng khi B7-H3 được biểu hiện trong mạch máu ung thư buồng trứng, tỷ lệ sống sót suy giảm.

Các phân tử họ B7 được cho là có liên quan đến hệ miễn dịch. B7-H3 đã được báo cáo là được biểu hiện trong các bạch cầu đơn nhân to, các tế bào đuôi gai, và các tế bào T hoạt hóa (tài liệu phi sáng chế 15). Đã được báo cáo rằng khi các tế bào T gây độc tế bào được hoạt hóa, B7-H3 đồng kích thích quá trình tăng sinh của các tế bào T dương tính với CD4 hoặc dương tính với CD8. Tuy nhiên, cũng có báo cáo rằng B7-H3 không đóng vai trò đồng kích thích này (tài liệu phi sáng chế 1).

Các phân tử B7-H3 đã được báo cáo là có liên quan đến các bệnh tự miễn dịch. Đã được báo cáo rằng trong bệnh thấp khớp và các bệnh tự miễn dịch khác, B7-H3 đóng vai trò quan trọng trong sự tương tác giữa các tế bào hoạt dịch giống nguyên bào sợi và các tế bào T được hoạt hóa (tài liệu phi sáng chế 16) và rằng của B7-H3 có chức năng làm yếu tố đồng kích thích miễn dịch khi các xytokin được giải phóng ra khỏi các đại thực bào được hoạt hóa và do đó có liên quan đến sự xuất hiện của bệnh nhiễm khuẩn (tài liệu phi sáng chế 17). Ngoài ra, đã được báo cáo rằng bằng cách cung cấp kháng thể kháng B7-H3 vào mô hình chuột mắc bệnh hen trong pha cảm ứng, bệnh hen được cải thiện do sự hạn chế việc sản sinh ra xytokin qua trung gian tế bào Th2 trong các nút hạch bạch huyết vùng thông qua việc sử dụng kháng thể kháng B7-H3 ở chuột (tài liệu phi sáng chế 18).

Đối với B7-H3, đã được báo cáo rằng kháng thể kháng B7-H3 ở chuột làm tăng cường các tế bào T dương tính với CD8 xâm nhập trong khối u và hạn chế sự phát triển của khối u (tài liệu phi sáng chế 14). Ngoài ra, có sáng chế bộc lộ rằng kháng thể mà nhận diện biến thể 1 của B7-H3 thể hiện hiệu quả chống ung thư *in vivo* ở bệnh ung thư tuyến (adenocarcinoma) (tài liệu sáng chế 1).

Mặc dù đã có các nghiên cứu này, epitop đối với kháng thể kháng B7-H3 mà thể hiện hiệu quả chống khối u *in vivo* đã không được phân loại, và đã không có báo cáo rằng trình tự axit amin đặc hiệu của vùng ngoại bào của B7-H3 là hữu ích dùng làm epitop đối với kháng thể đơn dòng để điều trị ung thư.

Thậm chí, nếu các kháng thể là đặc hiệu đối với cùng một kháng nguyên, các tính chất của các kháng thể này có thể biến đổi do sự khác nhau về các epitop hoặc các trình tự của các kháng thể này. Do sự khác nhau về các tính chất của các kháng thể này, khi được sử dụng lâm sàng cho người, các kháng thể này thể hiện các phản ứng khác nhau đối với hiệu quả của tác nhân điều trị, tần suất của các đáp ứng điều trị, tác động của các phản ứng phụ hoặc sự kháng thuốc, v.v..

Cũng liên quan đến các kháng thể kháng B7-H3, việc tạo ra kháng thể có các tính chất chưa từng biết đến đang có nhu cầu lớn.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO 2008/066691

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: The Journal of Immunology, 2004, vol. 172, pp. 2352-2359

Tài liệu phi sáng chế 2: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, vol. 105, pp. 10495-10500

Tài liệu phi sáng chế 3: European Journal of Immunology, 2009, vol. 39 pp. 1754-1764

Tài liệu phi sáng chế 4: Lung Cancer, 2009, vol. 66, pp. 245-249

Tài liệu phi sáng chế 5: Clinical Cancer Research, 2008, vol. 14, pp. 5150-5157

Tài liệu phi sáng chế 6: Clinical Cancer Research 2008, vol. 14, pp. 4800-4808

Tài liệu phi sáng chế 7: Cancer Immunology, Immunotherapy, 2010, vol. 59, pp. 1163-1171

Tài liệu phi sáng chế 8: Cancer Research, 2007, vol. 67, pp. 7893-7900

Tài liệu phi sáng chế 9: Histopathology, 2008, vol. 53, pp. 73-80

Tài liệu phi sáng chế 10: Modern Pathology, 2010, vol. 23, pp. 1104-1112

Tài liệu phi sáng chế 11: British Journal of Cancer, 2009, vol. 101, pp. 1709-1716

Tài liệu phi sáng chế 12: Current Cancer Drug Targets, 2008, vol. 8, pp. 404-413

Tài liệu phi sáng chế 13: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, vol. 101, pp. 12640-12645

Tài liệu phi sáng chế 14: Modern Pathology, 2010, vol. 23, pp. 1104-1112

Tài liệu phi sáng chế 15: Nature Immunology, 2001, vol. 2, pp. 269-274

Tài liệu phi sáng chế 16: The Journal of Immunology, 2008, vol. 180, pp. 2989-2998

Tài liệu phi sáng chế 17: The Journal of Immunology, 2010, vol. 185, pp. 3677-3684

Tài liệu phi sáng chế 18: The Journal of Immunology, 2008, vol. 181, pp. 4062-4071.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể và mảnh chức năng của kháng thể này để sử dụng trong dược phẩm có tác dụng điều trị khối u, phương pháp điều trị khối u sử dụng kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này, và các mục đích tương tự.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu sâu rộng để đạt được mục đích nêu trên, và kết quả là, đã phát hiện ra rằng kháng thể mà liên kết đặc hiệu với B7-H3 thể hiện hoạt tính chống ung thư, và do đó đã hoàn thành sáng chế. Đó là, sáng chế này bao gồm các sáng chế sau.

(1) Kháng thể khác biệt ở chỗ có các tính chất sau:

(a) liên kết đặc hiệu với B7-H3;

(b) có hoạt tính thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP);
và

(c) có hoạt tính chống khối u *in vivo*,

hoặc mảnh chức năng của kháng thể này.

(2) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (1) nêu trên, trong đó B7-H3 là phân tử bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc 10.

(3) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (1) hoặc (2) nêu trên, mà liên kết với IgC1 và/hoặc IgC2, mỗi loại trong số chúng là vùng B7-H3.

(4) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (3) nêu trên, trong đó IgC1 là vùng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 140 đến 244 trong SEQ ID NO: 6, và IgC2 là vùng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 358 đến 456 trong SEQ ID NO: 6.

(5) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), mà có hoạt tính ức chế cạnh tranh kháng kháng thể M30 đối với quá trình liên kết với B7-H3.

(6) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5), mà có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

(7) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6), trong đó khối u là bệnh ung thư.

(8) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (7) nêu trên, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tụy, ung thư kết trực tràng, u hắc sắc tố, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư thực quản, hoặc ung thư thận.

(9) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (8), bao gồm CDRH1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ

ID NO: 92, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 93, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94 dùng làm các vùng xác định hỗ trợ của chuỗi nặng và chứa CDRL1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 95, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 96, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 97 dùng làm các vùng xác định hỗ trợ của chuỗi nhẹ.

(10) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (9), mà bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 23 đến 130 trong SEQ ID NO: 53.

(11) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (10), trong đó vùng hằng định là vùng hằng định có nguồn gốc từ người.

(12) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (11) nêu trên, bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59.

(13) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (12), trong đó chúng được làm giống người.

(14) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (13) nêu trên, bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (a) trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85, (b) trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 87, (c) trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 89, (d) trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91, (e) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự bất kỳ trong các trình tự (a) đến (d), và (f) trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin bị mất, thay thế hoặc bổ sung trong trình tự bất kỳ từ (a) đến (d); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (g) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 71, (h) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 73, (i) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 75, (j) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 77, (k) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID

NO: 79, (l) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 81, (m) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 83, (n) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự bất kỳ từ (g) đến (m), và (o) trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin bị mất, thay thế hoặc bổ sung trong trình tự bất kỳ từ (g) đến (m).

(15) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (14) nêu trên, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 71; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 73; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 75; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 77; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 79; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 81; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ consisting of trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 83; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 71; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 73; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 75; và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ

21 đến 128 trong SEQ ID NO: 77.

(16) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (14) nêu trên hoặc (15), bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 71; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 73; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 75; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 77; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 79; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 81; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 83; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 71; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 73; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 75; và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 77.

(17) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (14) đến (16), bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 75; chuỗi nặng

bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 79; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 81; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 83; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 75; và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77.

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

(19) Polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (18).

(20) Polynucleotit theo mục (19) nêu trên, bao gồm trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 50 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 67 đến 390 trong SEQ ID NO: 52.

(21) Polynucleotit theo mục (19) hoặc (20) nêu trên, bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58.

(22) Polynucleotit theo mục (19) hoặc (20) nêu trên, bao gồm: trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84, (b) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 86, (c) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 88, (d) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90, và (e) trình tự nucleotit bao gồm polynucleotit mà lai với polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với trình tự bất kỳ từ (a) đến (d) dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (f) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 70, (g) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 72, (h) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ

ID NO: 74, (i) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 76, (j) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 78, (k) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 80, (l) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 82, và (m) trình tự nucleotit bao gồm polynucleotit mà lai với polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với trình tự bất kỳ từ (f) đến (l) dưới các điều kiện nghiêm ngặt.

(23) Polynucleotit theo mục (22) nêu trên, bao gồm các trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm: trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 74; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 76; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 78; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 80; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 82; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 74; và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 76.

(24) Polynucleotit theo mục (22) hoặc (23) nêu trên, bao gồm các trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm: trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 74; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến

699 trong SEQ ID NO: 76; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 78; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 80; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 82; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 74; và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 76.

(25) Polynucleotit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (22) đến (24), bao gồm các trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm: trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 74; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 76; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 78; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 80; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 82; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 74; và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 76.

(26) Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (19) đến (25).

(27) Tế bào chủ, mà được biến nạp với vector biểu hiện theo mục (26) nêu trên.

(28) Tế bào chủ hiện theo mục (27) nêu trên, trong đó tế bào chủ này là là tế bào có nhân điển hình.

(29) Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này, khác biệt ở chỗ bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo mục (27) hoặc (28) nêu trên và bước thu gom kháng thể mong muốn hoặc mảnh chức năng của kháng thể này từ sản phẩm nuôi cấy thu được trong bước nuôi cấy này.

(30) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này, khác biệt ở chỗ thu được bằng phương pháp sản xuất theo mục (29) nêu trên.

(31) Mảnh chức năng của kháng thể này theo mục (30) nêu trên, trong đó mảnh chức năng này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, F(ab)₂, Fab' và Fv.

(32) Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (18), (30), và (31), trong đó sự biến đổi của glycan được điều hòa để tăng cường hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể.

(33) Dược phẩm khác biệt ở chỗ chứa ít nhất một trong các kháng thể này hoặc các mảnh chức năng của các kháng thể này theo mục (1) đến (18), và (30) đến (32) nêu trên.

(34) Dược phẩm theo mục (33) nêu trên, dùng để điều trị khối u.

(35) Dược phẩm để điều trị khối u khác biệt ở chỗ chứa ít nhất một trong các kháng thể này hoặc các mảnh chức năng của các kháng thể này theo mục (1) đến (18), và (30) đến (32) nêu trên và ít nhất một tác nhân điều trị ung thư.

(36) Dược phẩm theo mục (34) hoặc (35) nêu trên, trong đó khối u này là bệnh ung thư.

(37) Dược phẩm theo mục (36) nêu trên, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tụy, ung thư kết trực tràng, u hắc sắc tố, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư thực quản, hoặc ung thư thận.

(38) Phương pháp điều trị khối u, khác biệt ở chỗ sử dụng ít nhất một trong các kháng thể này hoặc các mảnh chức năng của các kháng thể này theo mục (1) đến (18), và (30) đến (32) nêu trên cho cá thể.

(39) Phương pháp điều trị khối u, khác biệt ở chỗ sử dụng ít nhất một trong các kháng thể này hoặc các mảnh chức năng của các kháng thể này theo mục (1) đến (18), và (30) đến (32) nêu trên và ít nhất một tác nhân điều trị ung thư theo cách

đồng thời, riêng lẻ, hoặc lần lượt cho cá thể.

(40) Phương pháp điều trị theo mục (38) hoặc (39) nêu trên, trong đó khối u là ung thư.

(41) Phương pháp điều trị theo mục (40) nêu trên, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tụy, ung thư kết trực tràng, u hắc sắc tố, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư thực quản, hoặc ung thư thận.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, tác nhân điều trị hoặc tác nhân tương tự để điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể mà liên kết với B7-H3 và có hoạt tính chống khối u kháng các tế bào ung thư có thể thu được.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt tính ADCP của kháng thể kháng B7-H3 kháng tế bào NCI-H322. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=3).

Fig.2 là hình vẽ thể hiện sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt tính ADCP của kháng thể kháng B7-H3 có bán trên thị trường kháng tế bào NCI-H322.

Fig.3 là hình vẽ thể hiện sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt tính ADCC của kháng thể M30 kháng tế bào 293 bị gây nhiễm bởi vector rỗng và các tế bào 293 biểu hiện B7-H3. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=3). Trong hình vẽ này, “giả” có nghĩa là hoạt tính ADCC của M30 kháng tế bào 293 bị gây nhiễm bởi vector rỗng, và “B7H3” có nghĩa là hoạt tính ADCC của M30 kháng các tế bào 293 biểu hiện B7-H3.

Fig.4 là hình vẽ thể hiện sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt tính CDC của kháng thể kháng B7-H3 kháng tế bào NCI-H322. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=3).

Fig.5-1 là hình vẽ thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể M30 kháng thể đột biến thiếu hụt B7-H3 (B7-H3 IgV1). Đường nét chấm thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể đối chứng, và đường nét liền thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể M30.

Fig.5-2 là hình vẽ thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể M30 kháng thể đột biến thiếu hụt B7-H3 (B7-H3 IgC1). Đường nét chấm thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể đối chứng, và đường nét liền thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể M30.

Fig.5-3 là hình vẽ thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể M30 kháng thể đột biến thiếu hụt B7-H3 (B7-H3 IgV2). Đường nét chấm thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể đối chứng, và đường nét liền thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể M30.

Fig.5-4 là hình vẽ thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể M30 kháng thể đột biến thiếu hụt B7-H3 (B7-H3 IgC2). Đường nét chấm thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể đối chứng, và đường nét liền thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể M30.

Fig.5-5 là hình vẽ thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể M30 kháng thể đột biến thiếu hụt B7-H3 (B7-H3 IgC1-V2-C2). Đường nét chấm thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể đối chứng, và đường nét liền thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể M30.

Fig.5-6 là hình vẽ thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể M30 kháng thể đột biến thiếu hụt B7-H3 (B7-H3 IgV2-C2). Đường nét chấm thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể đối chứng, và đường nét liền thể hiện đặc tính liên kết của kháng thể M30.

Fig.6 là hình vẽ thể hiện hoạt tính chống khối u của các kháng thể kháng B7-H3 kháng chuột nhất được cấy tế bào NCI-H322. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=10).

Fig.7 là hình vẽ thể hiện hoạt tính chống khối u của kháng thể M30 khi các đại thực bào được làm nghèo *in vivo*. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=8). Ngoài ra, “mm³” có nghĩa là “mm³”.

Fig.8 là hình vẽ thể hiện hoạt tính ADCP của kháng thể M30 và kháng thể cM30 kháng tế bào NCI-H322. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=4).

Fig.9 là hình vẽ thể hiện hoạt tính chống khối u của kháng thể M30 và kháng thể cM30 kháng chuột nhất được cấy các tế bào MDA-MB-231. Các thanh sai số

trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=9).

Fig.10-1 là hình vẽ thể hiện hoạt tính ức chế cạnh tranh của kháng thể cM30 và kháng thể M30-H1-L4 kháng M30 đối với quá trình liên kết với kháng nguyên polypeptit vùng ngoại bào của kháng nguyên của biến thể 1 của B7-H3. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=3).

Fig.10-2 là hình vẽ thể hiện hoạt tính ức chế cạnh tranh của kháng thể cM30 và kháng thể M30-H1-L4 kháng M30 đối với quá trình liên kết với kháng nguyên polypeptit vùng ngoại bào của kháng nguyên của biến thể 2 của B7-H3. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=3).

Fig.11 là hình vẽ thể hiện hoạt tính ADCP của kháng thể M30, kháng thể cM30, và kháng thể M30-H1-L4 kháng tế bào NCI-H322. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=4).

Fig.12 là hình vẽ thể hiện hoạt tính ADCC của kháng thể cM30 và kháng thể M30-H1-L4 kháng tế bào NCI-H322. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=3).

Fig.13-1 thể hiện trình tự nucleotit của biến thể 1 của B7-H3 (SEQ ID NO: 5).

Fig.13-2 thể hiện trình tự axit amin của biến thể 1 của B7-H3 (SEQ ID NO: 6).

Fig.14-1 thể hiện trình tự nucleotit của biến thể 2 của B7-H3 (SEQ ID NO: 9).

Fig.14-2 thể hiện trình tự axit amin của biến thể 2 của B7-H3 (SEQ ID NO: 10).

Fig.15-1 thể hiện trình tự nucleotit của B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 20).

Fig.15-2 thể hiện trình tự axit amin của B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 21).

Fig.16-1 thể hiện trình tự nucleotit của B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 22).

Fig.16-2 thể hiện trình tự axit amin của B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 23).

Fig.17-1 thể hiện trình tự nucleotit của B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 24).

Fig.17-2 thể hiện trình tự axit amin của B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 25).

Fig.18-1 thể hiện trình tự nucleotit của B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 26).

Fig.18-2 thể hiện trình tự axit amin của B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 27).

Fig.19-1 thể hiện trình tự nucleotit của B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 28).

Fig.19-2 thể hiện trình tự axit amin của B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 29).

Fig.20-1 thể hiện trình tự nucleotit của B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 30).

Fig.20-2 thể hiện trình tự axit amin của B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 31).

Fig.21-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 50).

Fig.21-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 51).

Fig.22-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 52).

Fig.22-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 53).

Fig.23 thể hiện trình tự nucleotit của tín hiệu gây tiết chuỗi κ ở người, vùng hằng định chuỗi κ ở người, và tín hiệu bổ sung poly-A ở người (SEQ ID NO: 56).

Fig.24 thể hiện trình tự nucleotit của trình tự tín hiệu và vùng hằng định của IgG1 ở người (SEQ ID 57).

Fig.25-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại thể khảm của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 58).

Fig.25-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại thể khảm của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 59).

Fig.26-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại thể khảm của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 62).

Fig.26-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng loại thể khảm của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 63).

Fig.27-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L1 (SEQ ID NO: 70).

Fig.27-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L1 (SEQ ID NO: 71).

Fig.28-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L2 (SEQ ID NO: 72).

Fig.28-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L2 (SEQ ID NO: 73).

Fig.29-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L3 (SEQ ID NO: 74).

Fig.29-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L3 (SEQ ID NO: 75).

Fig.30-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L4 (SEQ ID NO: 76).

Fig.30-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L4 (SEQ ID NO: 77).

Fig.31-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L5 (SEQ ID NO: 78).

Fig.31-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L5 (SEQ ID NO: 79).

Fig.32-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L6 (SEQ ID NO: 80).

Fig.32-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L6 (SEQ ID NO: 81).

Fig.33-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L7 (SEQ ID NO: 82).

Fig.33-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L7 (SEQ ID NO: 83).

Fig.34-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H1 (SEQ ID NO: 84).

Fig.34-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H1 (SEQ ID NO: 85).

Fig.35-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H2 (SEQ ID NO: 86).

Fig.35-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H2 (SEQ ID NO: 87).

Fig.36-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H3 (SEQ ID NO: 88).

Fig.36-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H3 (SEQ ID NO: 89).

Fig.37-1 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H4 (SEQ ID NO: 90).

Fig.37-2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H4 (SEQ ID NO: 91).

Fig.38 là hình vẽ thể hiện hoạt tính chống khối u của kháng thể M30 được làm giống người (M30-H1-L4) kháng chuột nhắt được cấy các tế bào MDA-MB-231. Các thanh sai số trong hình vẽ thể hiện sai số chuẩn (n=6).

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “ung thư” và “khối u” như được sử dụng ở đây là được sử dụng với cùng ý nghĩa.

Thuật ngữ “gen” như được sử dụng ở đây bao gồm không chỉ ADN, mà còn là mARN của nó, cADN của nó và cARN của nó.

Thuật ngữ “polynucleotit” như được sử dụng ở đây là được sử dụng với cùng ý nghĩa như axit nucleic và cũng bao gồm ADN, ARN, các đoạn dò, oligonucleotit,

và các đoạn mồi.

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

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

Thuật ngữ “B7-H3” như được sử dụng ở đây là được sử dụng với cùng ý nghĩa như protein B7-H3, và cũng đề cập đến biến thể 1 của B7-H3 và/hoặc biến thể 2 của B7-H3.

Thuật ngữ “tổn thương tế bào” như được sử dụng ở đây đề cập đến trạng thái mà sự biến đổi bệnh lý gây ra cho tế bào ở một số dạng, và tổn thương tế bào không chỉ giới hạn ở tổn thương trực tiếp và bao gồm tất cả các loại tổn thương cấu trúc và chức năng của tế bào như sự phân cắt ADN, sự hình thành dime bazơ, sự phân cắt nhiễm sắc thể, gây tổn thương đến cơ chế phân chia tế bào, và suy giảm các hoạt tính enzyme khác nhau.

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

Thuật ngữ “hoạt hóa của thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể” như được sử dụng ở đây đề cập đến “sự hoạt hóa đại thực bào phụ thuộc vào kháng thể” và có nghĩa là sự hoạt hóa của các tế bào đích gây thực bào như các tế bào khối u bởi các bạch cầu đơn nhân to hoặc các đại thực bào qua trung gian kháng thể. Thuật ngữ này cũng được gọi là “sự hoạt hóa thực bào phụ thuộc kháng thể”.

Thuật ngữ “hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể” như được sử dụng ở đây đề cập đến “hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC)” và có nghĩa là sự hoạt hóa gây tổn thương các tế bào đích như các tế bào khối u bởi các tế bào NK qua trung gian kháng thể.

Thuật ngữ “hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể” như được sử dụng ở đây đề cập đến “hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)” và có nghĩa là sự hoạt hóa gây tổn thương các tế bào đích như các tế bào khối u bởi bổ thể qua trung gian kháng thể.

Thuật ngữ “mảnh chức năng của kháng thể” như được sử dụng ở đây đề cập đến đoạn riêng phần của kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên, trong đó đoạn

này có đầy đủ chức năng hoặc một phần chức năng của kháng thể, bao gồm Fab, F(ab')₂, scFv, và các dạng tương tự. Thuật ngữ này cũng bao gồm Fab' mà là đoạn hóa trị một trong vùng biến đổi của kháng thể thu được bằng cách xử lý F(ab')₂ dưới các điều kiện khử. Tuy nhiên, thuật ngữ này không chỉ giới hạn ở các phân tử này, miễn sao đoạn này có ái lực liên kết đối với kháng nguyên. Ngoài ra, các mảnh chức năng này bao gồm không chỉ đoạn thu được bằng cách xử lý phân tử có độ dài đầy đủ của protein kháng thể với enzyme thích hợp, mà còn bao gồm protein được tạo ra trong tế bào chủ thích hợp sử dụng gen kháng thể được biến đổi di truyền.

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

Thuật ngữ “epitop” như được sử dụng ở đây đề cập đến peptit riêng phần hoặc cấu trúc bậc ba riêng phần của B7-H3 mà liên kết đặc hiệu với kháng thể kháng B7-H3. Epitop mà là peptit riêng phần của B7-H3 được mô tả trên đây có thể được xác định bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này như phương pháp thử nghiệm miễn dịch, và ví dụ, phương pháp sau có thể được sử dụng. Đầu tiên, các cấu trúc riêng phần khác nhau của kháng nguyên được tạo ra. Trong phương pháp tạo ra cấu trúc riêng phần này, kỹ thuật tổng hợp oligopeptit đã biết có thể được sử dụng. Ví dụ, một loạt các polypeptit có độ dài giảm thích hợp thu được bằng cách làm ngắn B7-H3 theo thứ tự từ đầu tận cùng C hoặc đầu tận cùng N là được tạo ra sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau đó, khả năng phản ứng của kháng thể kháng các polypeptit này được đánh giá và vị trí nhận diện được xác định sơ bộ. Sau đó, các peptit có chiều dài ngắn hơn được tổng hợp và khả năng phản ứng của kháng thể với các peptit này được đánh giá, nhờ đó epitop có thể được xác định. Ngoài ra, epitop mà là cấu trúc bậc ba riêng phần của kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu kháng thể có thể được xác định chỉ rõ các gốc axit amin của kháng nguyên mà nằm liền kề với kháng thể bằng cách phân tích cấu trúc bằng tia X.

Cụm từ “các kháng thể mà liên kết với cùng một epitop” như được sử dụng ở đây đề cập đến các kháng thể khác nhau mà liên kết với epitop thông thường. Nếu kháng thể thứ hai liên kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc bậc ba riêng phần mà kháng thể thứ nhất liên kết với, có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng một epitop. Hơn nữa, bằng cách khẳng định rằng

kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất đối với quá trình liên kết với kháng nguyên (tức là, kháng thể thứ hai ức chế sự liên kết giữa kháng thể thứ nhất và kháng nguyên), có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng một epitop ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc của epitop đặc hiệu này chưa được xác định. Ngoài ra, khi kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng một epitop và kháng thể thứ nhất cũng có hoạt tính đặc hiệu như hoạt tính chống ung thư, có thể mong đợi rằng kháng thể thứ hai cũng có cùng hoạt tính. Theo đó, khi kháng thể thứ hai kháng B7-H3 liên kết với peptit riêng phần mà kháng thể thứ nhất kháng B7-H3 liên kết với, có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng một epitop của B7-H3. Hơn nữa, bằng cách khẳng định rằng kháng thể thứ hai kháng B7-H3 cạnh tranh với kháng thể thứ nhất kháng B7-H3 đối với quá trình liên kết với B7-H3, có thể xác định được rằng kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai là các kháng thể mà liên kết với cùng một epitop của B7-H3.

Thuật ngữ “CDR” như được sử dụng ở đây đề cập đến vùng xác định bổ trợ (CDR), và đã biết rằng mỗi chuỗi nặng và nhẹ của phân tử kháng thể có ba vùng xác định bổ trợ (CDRs). CDR này cũng được gọi là vùng siêu biến, có mặt trong vùng biến đổi của mỗi chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể. Đó là vị trí mà có độ biến đổi bất thường cao trong cấu trúc bậc một của nó, và có ba CDR riêng biệt trong cấu trúc bậc một của mỗi chuỗi polypeptit nặng và nhẹ. trong bản mô tả này, liên quan đến các CDR của kháng thể, các CDR của chuỗi nặng được thể hiện dưới dạng CDRH1, CDRH2, và CDRH3 từ phía đầu amino của trình tự axit amin của chuỗi nặng, và các CDR của chuỗi nhẹ được thể hiện dưới dạng CDRL1, CDRL2, và CDRL3 từ phía đầu amino của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ. các vị trí này là gần nhau trong cấu trúc bậc ba và xác định tính đặc hiệu đối với kháng nguyên mà kháng thể này liên kết.

Cụm từ “quá trình lai hóa được tiến hành dưới các điều kiện nghiêm ngặt” như được sử dụng ở đây đề cập đến quy trình mà trong đó quá trình lai hóa được tiến hành dưới các điều kiện mà sự đồng nhất có thể đạt được bằng cách tiến hành lai hóa ở 68°C trong dung dịch lai hóa có bán trên thị trường ExpressHyb Hybridization Solution (được sản xuất bởi Clontech, Inc.) hoặc bằng cách tiến hành lai hóa ở 68°C với sự có mặt của 0,7 đến 1,0 M NaCl sử dụng bộ lọc có ADN được cố định trên đó, sau đó bằng cách tiến hành rửa ở 68°C sử dụng dung dịch 0,1 đến 2 x SSC (dung dịch SSC 1 x chứa 150 mM NaCl và 15 mM natri xitrat) hoặc dưới các điều kiện tương đương với nó.

1. B7-H3

B7-H3 là thành viên của họ B7 được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên dưới dạng phân tử đồng kích thích, và được xem là tác dụng lên thụ thể trên các tế bào T để làm tăng cường hoặc làm giảm hoạt tính miễn dịch.

B7-H3 là protein có cấu trúc một vùng chuyển màng, và vùng ngoại bào đầu tận cùng N của B7-H3 chứa hai biến thể. Biến thể 1 của B7-H3 (4Ig-B7-H3) lần lượt chứa vùng Ig giống V hoặc giống C ở hai vị trí, và biến thể 2 của B7-H3 (2Ig-B7-H3) chứa vùng Ig giống V hoặc giống C ở một vị trí.

Đối với B7-H3 được sử dụng trong sáng chế này, B7-H3 có thể được tinh chế trực tiếp từ các tế bào biểu hiện B7-H3 của động vật có vú là người hoặc không phải người (như chuột cống hoặc chuột nhắt) và được sử dụng, hoặc phân đoạn màng tế bào của các tế bào được mô tả trên đây có thể được chuẩn bị và sử dụng. Ngoài ra, B7-H3 có thể thu được bằng cách tổng hợp in vitro hoặc sản sinh ra nó trong tế bào chủ thông qua kỹ thuật di truyền. Trong kỹ thuật di truyền này, cụ thể, sau khi B7-H3 cADN được gắn vào trong vector có thể biểu hiện B7-H3 cADN, B7-H3 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch chứa các enzym, cơ chất và chất cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện B7-H3 trong tế bào chủ biến nạp không có nhân điển hình và có nhân điển hình khác.

Trình tự nucleotit của khung đọc mở (ORF) của biến thể 1 ở người của gen B7-H3 được nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, các trình tự của SEQ ID NO: 5 và 6 được thể hiện trong Fig.13.

Trình tự nucleotit của ORF của biến thể 2 của người của gen B7-H3 được nêu trong SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, các trình tự của SEQ ID NO: 9 và 10 được thể hiện trong Fig.14.

Hơn nữa, protein mà bao gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin được thay thế, mất và/hoặc bổ sung vào trong trình tự bất kỳ của các trình tự axit amin được mô tả trên đây của B7-H3 và cũng có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của protein này là cũng được bao gồm trong B7-H3.

Biến thể 1 của B7-H3 ở người trưởng thành mà từ đó trình tự tín hiệu đã tách

loại tương ứng với trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 27 đến 534 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Ngoài ra, biến thể 2 của B7-H3 ở người trưởng thành mà từ đó trình tự tín hiệu đã loại bỏ tương ứng với trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin 27 đến 316 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Trong biến thể 1 của B7-H3, các vùng tương ứng là có mặt theo thứ tự IgV1, IgC1, IgV2, và IgC2 từ đầu tận cùng N, và trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, IgV1 tương ứng với các số axit amin từ 27 đến 139, IgC1 tương ứng với các số axit amin từ 140 đến 244, IgV2 tương ứng với các số axit amin từ 245 đến 357, và IgC2 tương ứng với các số axit amin từ 358 đến 456. Ngoài ra, trong biến thể 2 của B7-H3, các vùng tương ứng là có mặt theo thứ tự IgV1 và IgC2 từ đầu tận cùng N, và trong SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự, IgV1 tương ứng với các số axit amin từ 27 đến 140 và IgC2 tương ứng với các số axit amin từ 141 đến 243.

B7-H3 cADN có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp được gọi là PCR trong đó phản ứng chuỗi polymeraza (dưới đây được gọi là “PCR”) được tiến hành sử dụng thư viện cADN biểu hiện B7-H3 cADN làm khuôn và các đoạn môi mà khuếch đại đặc hiệu B7-H3 cADN (Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, 487-49). Ngoài ra, polynucleotit mà lai với polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc 9 trong danh mục trình tự dưới các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa protein có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của B7-H3 là cũng được bao gồm trong B7-H3 cDNA. Ngoài ra, polynucleotit mà là biến thể tách intron sao mã được từ locut B7-H3 ở người hoặc chuột nhắt hoặc polynucleotit mà lai với polynucleotit gồm trình tự nucleotit bổ sung của nó dưới các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa protein có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của B7-H3 là cũng được bao gồm trong B7-H3 cDNA.

Ngoài ra, protein mà bao gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin được thay thế, mất hoặc bổ sung trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc 10 trong danh mục trình tự hoặc trình tự axit amin thu được bằng cách tách trình tự tín hiệu ra khỏi một trong hai trình tự này và có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của B7-H3 là cũng được bao gồm trong B7-H3. Ngoài ra, protein mà bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi biến thể tách intron được phiên mã từ locut B7-H3 ở người hoặc chuột nhắt hoặc trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin được thay thế, mất hoặc bổ sung trong trình tự axit amin nêu trên và có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của B7-H3 là

cũng được bao gồm trong B7-H3.

2. Sản xuất kháng thể kháng B7-H3

Kháng thể kháng B7-H3 của sáng chế có thể thu được bằng cách gây miễn dịch cho động vật với B7-H3 hoặc polypeptit bất kỳ được chọn từ trình tự axit amin của B7-H3, và thu gom và tinh chế kháng thể tạo ra được *in vivo* theo các phương pháp thông thường. Các gốc sinh học của B7-H3 được sử dụng làm kháng nguyên là không chỉ giới hạn ở người, và động vật có thể được gây miễn dịch với B7-H3 có nguồn gốc từ động vật không phải người như chuột nhắt hoặc chuột cống. Trong trường hợp này, bằng cách đánh giá khả năng phản ứng chéo giữa kháng thể liên kết với B7-H3 dị tương đồng thu được và B7-H3 người, kháng thể này có thể sử dụng cho các bệnh của người có thể được lựa chọn.

Hơn nữa, kháng thể đơn dòng có thể thu được từ tế bào lai có sẵn bằng cách dung hợp các tế bào tạo ra kháng thể mà tạo ra kháng thể kháng B7-H3 với các tế bào u tủy bằng các phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler và Milstein, *Nature*, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

Ngoài ra, B7-H3 được dùng làm kháng nguyên có thể thu được bằng cách biểu hiện gen B7-H3 trong tế bào chủ sử dụng kỹ thuật di truyền.

Cụ thể, vector có khả năng biểu hiện gen B7-H3 được tạo ra, và vector thu được được truyền nhiễm vào trong tế bào chủ để biểu hiện gen này, và sau đó, B7-H3 được biểu hiện được tinh chế. Dưới đây, phương pháp thu được kháng thể kháng B7-H3 sẽ được mô tả cụ thể.

(1) Điều chế kháng nguyên

Các ví dụ về kháng nguyên được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng B7-H3 bao gồm B7-H3, polypeptit bao gồm trình tự axit amin riêng phần bao gồm ít nhất 6 axit amin liên tiếp của B7-H3, và dẫn xuất thu được bằng cách bổ sung trình tự axit amin đã cho hoặc chất mang của nó.

B7-H3 có thể được tinh chế trực tiếp từ các mô khối u của người hoặc các tế bào khối u và được sử dụng. Ngoài ra, B7-H3 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó *in vitro* hoặc bằng cách tạo ra nó trong tế bào chủ bằng kỹ thuật di truyền.

Cụ thể, đối với kỹ thuật di truyền này, sau khi B7-H3 cADN được hợp nhất

vào trong vector có khả năng biểu hiện B7-H3 cADN, B7-H3 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch chứa các enzym, cơ chất và các chất cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện B7-H3 trong tế bào chủ biến nạp không có nhân điển hình và có nhân điển hình khác.

Ngoài ra, kháng nguyên này cũng có thể thu được dưới dạng protein tiết bằng cách biểu hiện protein dung hợp thu được bằng cách liên kết với vùng ngoại bào của B7-H3, mà là protein màng, với vùng hằng định của kháng thể trong hệ vector chủ thích hợp.

B7-H3 cADN có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp được gọi là PCR trong đó phản ứng chuỗi polymeraza (dưới đây được gọi là “PCR”) được tiến hành sử dụng dụng cụ thư viện cADN biểu hiện B7-H3 cADN dùng làm khuôn và các đoạn mồi mà khuếch đại đặc hiệu B7-H3 cADN (xem tài liệu: Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489).

Dùng làm hệ thống tổng hợp in vitro polypeptit, ví dụ, hệ thống dịch mã nhanh (Rapid Translation System -RTS) được sản xuất bởi Roche Diagnostics, Inc. có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở nó.

Các ví dụ về các tế bào chủ không có nhân điển hình bao gồm *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*. Để biến nạp các tế bào chủ với gen đích, các tế bào chủ được biến nạp bằng vector plasmit chứa đơn vị sao chép, tức là, điểm khởi đầu đơn vị sao chép có nguồn gốc từ các loài tương thích với chủ, và trình tự điều hòa. Ngoài ra, tốt hơn nếu vector này có trình tự có khả năng áp đặt sự lựa chọn kiểu hình lên tế bào được biến nạp.

Do đó thể biến nạp thu được có thể được nuôi cấy bằng các phương pháp thông thường, và bằng cách nuôi cấy thể biến nạp, polypeptit đích được tạo ra bên trong hoặc bên ngoài tế bào.

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

Protein tái tổ hợp được tạo ra bên trong hoặc bên ngoài tế bào bằng thể biến nạp thông qua quy trình nuôi cấy này có thể được tách và tinh chế bằng các phương

pháp tách khác nhau đã biết sử dụng các tính chất vật lý và hóa học của protein.

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

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

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

(2) Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng B7-H3

Các ví dụ về kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 bao gồm kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với B7-H3, và phương pháp thu được kháng thể này được mô tả dưới đây.

Việc sản xuất kháng thể đơn dòng này thường đòi hỏi các bước sau:

- (a) tinh chế polyme sinh học được dùng làm kháng nguyên;
- (b) chuẩn bị các tế bào tạo ra kháng thể bằng cách gây miễn dịch cho động vật bằng cách tiêm kháng nguyên, thu gom máu, thử nghiệm độ chuẩn kháng thể của nó để xác định khi lá lách được cắt;
- (c) chuẩn bị các tế bào u tủy (dưới đây được gọi là "u tủy");
- (d) dung hợp các tế bào sinh kháng thể với u tủy này;
- (e) sàng lọc nhóm tế bào lai tạo ra kháng thể mong muốn;
- (f) chia tế bào lai thành các dòng tế bào đơn (tách dòng);
- (g) tùy ý, nuôi cấy tế bào lai này hoặc chăm sóc động vật được cấy tế bào lai này để tạo ra lượng lớn kháng thể đơn dòng;
- (h) đánh giá hoạt tính sinh học của kháng thể đơn dòng được tạo ra và tính

đặc hiệu liên kết, hoặc đánh giá các đặc tính của kháng thể dưới dạng chất phản ứng kháng thể được đánh dấu; và các phương pháp tương tự.

Dưới đây, phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng sẽ được mô tả chi tiết theo các bước nêu trên, tuy nhiên, phương pháp là không chỉ giới hạn ở đó, và, ví dụ, các tế bào tạo ra kháng thể khác tế bào lá lách và u tủy có thể được sử dụng.

(a) Tinh chế kháng nguyên

Dùng làm kháng nguyên, B7-H3 điều chế được bằng phương pháp như được mô tả trên đây hoặc peptit riêng phần của nó có thể được sử dụng.

Ngoài ra, phân đoạn màng tạo ra được từ các tế bào tái tổ hợp biểu hiện B7-H3 hoặc các tế bào tái tổ hợp biểu hiện bản thân B7-H3, và ngoài ra, peptit riêng phần của protein theo sáng chế được tổng hợp hóa học bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được dùng làm kháng nguyên.

(b) Chuẩn bị các tế bào tạo ra kháng thể

Kháng nguyên thu được trong bước (a) được trộn với chất bổ trợ như chất bổ trợ toàn vẹn hoặc không toàn vẹn của Freund hoặc nhôm kali sulfat và hỗn hợp thu được được dùng làm tác nhân gây miễn dịch để gây miễn dịch cho động vật thử nghiệm. Dùng làm động vật thử nghiệm, động vật bất kỳ trong phương pháp sản xuất tế bào lai đã biết có thể được sử dụng mà không gặp phải khó khăn. Cụ thể, ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, dê, cừu, bò, ngựa hoặc động vật tương tự có thể được sử dụng. Tuy nhiên, từ quan điểm dễ có sẵn của các tế bào u tủy cần dung hợp với các tế bào tạo ra kháng thể, chuột nhắt hoặc chuột cống được tách ra tốt hơn là được sử dụng làm động vật để gây miễn dịch.

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

Những con chuột nhắt và chuột cống này có bán trên thị trường từ người chăn nuôi/nhà phân phối các động vật thử nghiệm, ví dụ, CLEA Japan, Inc. và

Charles River Laboratories Japan, Inc.

Trong số chúng, xem xét đến tính tương hợp của quá trình dung hợp với các tế bào u tủy được mô tả dưới đây, trong trường hợp chuột nhắt, chủng BALB/c, và trong trường hợp chuột cống, các chủng Wistar và Low được ưu tiên đặc biệt dùng làm động vật được gây miễn dịch.

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

Tuổi của chuột nhắt hoặc chuột cống ở thời điểm gây miễn dịch tốt hơn là từ 5 đến 12 tuần tuổi, tốt hơn nữa là 6 đến 8 tuần tuổi.

Để gây miễn dịch động vật bằng B7-H3 hoặc thể tái tổ hợp của nó, ví dụ phương pháp đã biết được mô tả chi tiết trong, ví dụ, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) hoặc phương pháp tương tự có thể được sử dụng.

Trong số các phương pháp gây miễn dịch này, phương pháp cụ thể được ưu tiên theo sáng chế là, ví dụ, như sau.

Đó là, thứ nhất, phân đoạn protein màng dùng làm kháng nguyên hoặc các tế bào được làm cho biểu hiện kháng nguyên được sử dụng dưới da hoặc trong màng bụng cho động vật.

Tuy nhiên, sự kết hợp của cả hai đường dùng là được ưu tiên để làm tăng hiệu quả gây miễn dịch, và khi phương pháp sử dụng dưới da được tiến hành trong nửa thứ nhất và phương pháp sử dụng trong màng bụng được tiến hành nửa sau đó hoặc chỉ ở liều dùng cuối cùng, hiệu quả gây miễn dịch có thể được tăng lên một cách đặc biệt.

Lịch trình sử dụng kháng nguyên thay đổi phụ thuộc vào loại động vật được gây miễn dịch, sự khác nhau giữa các cá thể hoặc các yếu tố tương tự. Tuy nhiên, nhìn chung, lịch trình sử dụng mà trong đó số lần kháng nguyên được sử dụng là từ 3 đến 6 lần và khoảng thời gian dùng liều là từ 2 đến 6 tuần là được ưu tiên, và lịch trình sử dụng mà trong đó số lần kháng nguyên được sử dụng là 3 đến 4 lần và

khoảng thời gian dùng liều là 2 đến 4 tuần là được ưu tiên hơn.

Ngoài ra, liều dùng của kháng nguyên thay đổi phụ thuộc vào loại động vật, sự khác nhau giữa các cá thể hoặc các yếu tố tương tự, tuy nhiên, liều dùng này thường được thiết lập ở 0,05 đến 5 mg, tốt hơn nếu khoảng từ 0,1 đến 0,5 mg.

Quá trình gây miễn dịch tăng cường được tiến hành từ 1 đến 6 tuần, tốt hơn là 2 đến 4 tuần, tốt hơn nữa là 2 đến 3 tuần sau khi sử dụng kháng nguyên như được mô tả trên đây.

Liều dùng kháng nguyên ở thời điểm tiến hành gây miễn dịch tăng cường thay đổi phụ thuộc vào loại hoặc kích thước của động vật hoặc các yếu tố tương tự, tuy nhiên, trong trường hợp của, ví dụ, chuột nhắt, liều dùng này thường được thiết lập ở 0,05 đến 5 mg, tốt hơn là 0,1 đến 0,5 mg, tốt hơn nữa là khoảng 0,1 đến 0,2 mg.

Các tế bào lá lách hoặc các lympho bào bao gồm các tế bào tạo ra kháng thể được tách trong điều kiện vô khuẩn từ động vật được gây miễn dịch 1 đến 10 ngày, tốt hơn là 2 đến 5 ngày, tốt hơn nữa là 2 đến 3 ngày sau khi gây miễn dịch tăng cường. Ở thời điểm này, độ chuẩn kháng thể được đo, và nếu động vật có độ chuẩn kháng thể tăng đạt yêu cầu được dùng làm nguồn cấp các tế bào sinh kháng thể, phương pháp sau đó có thể được tiến hành hiệu quả hơn.

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

Ví dụ, nếu phương pháp ELISA được sử dụng, việc đo độ chuẩn kháng thể theo sáng chế có thể được tiến hành theo các phương pháp như được mô tả dưới đây.

Đầu tiên, kháng nguyên tinh khiết hoặc tinh khiết một phần được hấp phụ trên bề mặt của pha rắn như đĩa 96 lỗ cho thử nghiệm ELISA, và bề mặt của pha rắn không có kháng nguyên hấp phụ trên đó được bao phủ bởi protein không liên quan đến kháng nguyên như albumin huyết thanh bò (dưới đây được gọi là "BSA"). Sau khi rửa bề mặt, bề mặt này được tiếp xúc với mẫu được pha loãng theo loạt (ví dụ, huyết thanh chuột nhắt) dùng làm kháng thể sơ cấp để cho phép kháng thể này trong mẫu liên kết với kháng nguyên.

Ngoài ra, dùng làm kháng thể thứ cấp, kháng thể được đánh dấu bằng enzym

kháng thể chuột nhất được bổ sung và được cho phép liên kết với kháng thể chuột nhất này. Sau khi rửa, cơ chất cho enzym được bổ sung và sự thay đổi độ hấp thụ mà xảy ra sự phát triển màu gây ra do sự biến đổi của cơ chất hoặc các yếu tố tương tự là được đo và độ chuẩn kháng thể được tính dựa trên kết quả của phép đo này.

Việc tách các tế bào sinh kháng thể từ các tế bào lá lách hoặc các lympho bào của động vật được gây miễn dịch có thể được tiến hành theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler et al., *Nature* (1975), 256, p. 495; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* (1977), 6, p. 511; Milstein et al., *Nature* (1977), 266, p. 550; Walsh, *Nature* (1977), 266, p. 495). Ví dụ, trong trường hợp của tế bào lá lách, phương pháp chung mà trong đó các tế bào sinh kháng thể được tách bằng cách đồng nhất lá lách để thu được các tế bào nhờ vào quá trình lọc với lưới thép không gỉ và tạo huyền phù các tế bào này trong môi trường thiết yếu tối thiểu (MEM) của Eagle có thể được sử dụng.

(c) Chuẩn bị các tế bào u tủy (dưới đây được gọi là "u tủy")

Các tế bào u tủy được sử dụng để dung hợp tế bào là không bị giới hạn một cách cụ thể và các tế bào thích hợp có thể được chọn từ các dòng tế bào đã biết. Tuy nhiên, tính đến sự tiện lợi khi tế bào lai được chọn từ các tế bào được dung hợp, được ưu tiên là sử dụng chủng thiếu hụt hypoxantin-guanin phosphoribosyl transferaza (hypoxantin-guanine phosphoribosyl transferase- HGPRT) mà phương pháp lựa chọn đã được thiết lập.

Cụ thể hơn, các ví dụ về chủng thiếu hụt HGPRT này bao gồm X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1,7(45.6TG), FO, S149/5XXO, và BU,1 derived from mice; 210.RSY3.Ag,1,2.3(Y3) có nguồn gốc từ chuột cống; và U266AR(SKO-007), GM1500-GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) và 8226AR/NIP4-1(NP41) có nguồn gốc từ người. Các chủng thiếu hụt HGPRT này là có sẵn từ, ví dụ, bộ sưu tập chủng chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC) hoặc nguồn tương tự.

Các chủng tế bào này được nuôi cấy cấp hai trong môi trường thích hợp như môi trường 8-azaguanin [môi trường thu được bằng cách bổ sung 8-azaguanin vào môi trường RPMI 1640 được bổ sung glutamin, 2-mercaptoethanol, gentamixin, và huyết thanh bào thai bò (dưới đây được gọi là "FBS")], môi trường của Dulbecco được biến đổi bởi Iscove (dưới đây được gọi là "IMDM"), hoặc Môi trường Eagle

được biến đổi bởi Dulbecco (dưới đây được gọi là "DMEM"). Trong trường hợp này, 3 đến 4 ngày trước khi tiến hành dung hợp tế bào, các tế bào được nuôi cấy cấp hai trong môi trường thông thường [ví dụ, môi trường ASF104 (được sản xuất bởi Ajinomoto Co., Ltd.) chứa 10% FBS] để đảm bảo không thấp hơn 2×10^7 tế bào trên ngày của quá trình dung hợp tế bào.

(d) Dung hợp tế bào

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

Dùng làm phương pháp này, ví dụ, phương pháp hóa học mà trong đó các tế bào sinh kháng thể và các tế bào u tủy được trộn trong dung dịch chứa polyme như polyetylen glycol ở nồng độ cao, phương pháp vật lý sử dụng phương pháp kích thích bằng điện, hoặc phương pháp tương tự có thể được sử dụng. Trong số các phương pháp này, ví dụ cụ thể về phương pháp hóa học là như được mô tả dưới đây.

Đó là, trong trường hợp nếu polyetylen glycol được sử dụng trong dung dịch chứa polyme ở nồng độ cao, các tế bào sinh kháng thể và các tế bào u tủy được trộn trong dung dịch chứa polyetylen glycol có trọng lượng phân tử bằng 1500 đến 6000, tốt hơn nữa là 2000 đến 4000 ở nhiệt độ từ 30 đến 40°C, tốt hơn là từ 35 đến 38°C trong 1 đến 10 phút, tốt hơn là 5 đến 8 phút.

(e) Lựa chọn nhóm tế bào lai

Phương pháp lựa chọn các tế bào lai thu được bởi quá trình dung hợp tế bào được mô tả trên đây là không bị giới hạn cụ thể. Thông thường, phương pháp lựa chọn HAT (hypoxantin, aminopterin, thymidin) (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550) được sử dụng.

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

Đó là, bằng cách nuôi cấy các tế bào không được dung hợp và các tế bào lai

trong môi trường HAT, chỉ các tế bào lai kháng aminopterin được cho phép một cách chọn lọc sống sót và tăng sinh.

(f) Phân chia thành dòng tế bào đơn bào (tách dòng)

Dùng làm phương pháp tách dòng đối với các tế bào lai, phương pháp đã biết như phương pháp methylxenuloza, phương pháp agarosa mềm, hoặc phương pháp pha loãng giới hạn có thể được sử dụng (xem, ví dụ, Barbara, B. M. và Stanley, M. S.: *Selected Methods in Cellular Immunology*, W. H. Freeman và Company, San Francisco (1980)). Trong số các phương pháp này, đặc biệt, phương pháp nuôi cấy ba chiều như phương pháp methylxenuloza là được ưu tiên. Ví dụ, nhóm các tế bào lai tạo ra được bằng cách dung hợp tế bào được tạo huyền phù trong môi trường methylxenuloza như ClonaCell-HY Selection Medium D (được sản xuất bởi StemCell Technologies, inc., #03804) và được nuôi cấy. Sau đó, các dòng tế bào lai tạo ra được thu gom, nhờ đó có thể thu được các tế bào lai đơn dòng. Các dòng tế bào lai tương ứng được thu gom được nuôi cấy, và tế bào lai mà được khẳng định là có độ chuẩn kháng thể ổn định trong dịch nổi trong môi trường nuôi cấy tế bào lai thu được được lựa chọn làm dòng tế bào lai sản sinh ra kháng thể đơn dòng B7-H3.

Các ví dụ về dòng tế bào lai được tạo ra bao gồm tế bào lai B7-H3 M30. Ngoài ra, trong bản mô tả này, kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai B7-H3 M30 được gọi là “kháng thể M30” hoặc đơn giản là “M30”.

Chuỗi nặng của kháng thể M30 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, chuỗi nhẹ của kháng thể M30 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trong trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 51 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 142 đến 471 là vùng hằng định. Ngoài ra, trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 53 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 22 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin 23 đến 130 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin 131 đến 235 là vùng hằng định.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 51 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 50 trong danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 50 trong danh

mục trình tự, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 424 đến 1413 mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể.

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 53 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52 trong danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52 trong danh mục trình tự, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 66 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 67 đến 390 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 391 đến 705 mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể.

(g) Chuẩn bị kháng thể đơn dòng bằng cách nuôi cấy tế bào lai

Bằng cách nuôi cấy tế bào lai thu được, kháng thể đơn dòng có thể thu được một cách hiệu quả. Tuy nhiên, trước khi nuôi cấy, tốt hơn là tiến hành sàng lọc tế bào lai mà tạo ra kháng thể đơn dòng đích.

Trong quá trình sàng lọc này, phương pháp đã biết có thể được sử dụng.

Việc đo độ chuẩn kháng thể trong sáng chế có thể được tiến hành bằng, ví dụ, phương pháp ELISA được giải thích trong mục (b) được mô tả trên đây.

Tế bào lai thu được bằng phương pháp được mô tả trên đây có thể được bảo quản trong trạng thái đông băng trong nitơ lỏng hoặc trong thiết bị tạo kết đông ở -80°C hoặc thấp hơn.

Sau khi hoàn thành bước tách dòng, môi trường được thay đổi từ môi trường HT sang môi trường thông thường, và tế bào lai được nuôi cấy.

Việc nuôi cấy ở quy mô lớn được tiến hành bằng cách nuôi cấy quay sử dụng chai nuôi cấy lớn hoặc bằng cách nuôi cấy quay. Từ dịch nổi tế bào thu được bằng cách nuôi cấy quy mô lớn, kháng thể đơn dòng mà liên kết đặc hiệu với protein của sáng chế có thể thu được bằng cách tinh chế sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này như phương pháp lọc gel.

Ngoài ra, tế bào lai được tiêm vào trong khoang bụng của chuột nhắt của cùng chủng như tế bào lai (ví dụ, BALB/c được mô tả trên đây) hoặc chuột nhắt

Nu/Nu để tăng sinh tế bào lai, nhờ đó cổ trướng chứa lượng lớn kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể thu được.

Trong trường hợp nếu tế bào lai được sử dụng ở khoang bụng, nếu dầu khoáng như 2,6,10,14-tetrametyl pentadecan (pristan) được sử dụng 3 đến 7 ngày trước đó, lượng lớn hơn của cổ trướng có thể thu được.

Ví dụ, chất ức chế miễn dịch được tiêm trước vào trong khoang bụng của chuột nhắt của cùng dòng tế bào như tế bào lai để làm bất hoạt các tế bào T. 20 ngày sau đó, 10^6 đến 10^7 các tế bào dòng tế bào lai được tạo huyền phù trong môi trường không huyết thanh (0,5 ml), và huyền phù này được sử dụng cho khoang bụng của chuột nhắt. Nhìn chung, khi bụng được mở và được lấp đầy do cổ trướng, cổ trướng được thu gom từ chuột nhắt. Bằng phương pháp này, kháng thể đơn dòng có thể thu được ở nồng độ mà khoảng 100 lần hoặc cao hơn so với nồng độ trong dung dịch nuôi cấy.

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

Do đó, kháng thể đơn dòng thu được có tính đặc hiệu kháng nguyên cao đối với B7-H3.

(h) Thử nghiệm kháng thể đơn dòng

Kiểu tương đương hoặc phân lớp của kháng thể đơn dòng thu được này có thể được xác định như sau.

Đầu tiên, các ví dụ về phương pháp xác định bao gồm phương pháp Ouchterlony, phương pháp ELISA, và phương pháp RIA.

Phương pháp Ouchterlony đơn giản, nhưng khi nồng độ của kháng thể đơn dòng thấp, bước ngưng tụ là cần thiết.

Mặt khác, khi phương pháp ELISA hoặc phương pháp RIA được sử dụng, bằng cách phản ứng trực tiếp dịch nổi môi trường nuôi cấy với pha rắn hấp phụ kháng nguyên và sử dụng các kháng thể tương ứng với các loại khác nhau của các kiểu tương đương của globulin miễn dịch và các phân lớp dưới dạng các kháng thể thứ cấp, kiểu tương đương và phân lớp của kháng thể đơn dòng có thể được xác

định.

Ngoài ra, dùng làm phương pháp đơn giản hơn, kit xác định có bán trên thị trường (ví dụ, mouse Typer Kit được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) hoặc phương pháp tương tự có thể được sử dụng.

Ngoài ra, việc định lượng protein có thể được tiến hành bằng phương pháp Folin Lowry và phương pháp tính dựa trên độ hấp thụ ở 280 nm [$1,4 (OD\ 280) = \text{Immunoglobulin } 1\text{ mg/ml}$].

Ngoài ra, thậm chí khi kháng thể đơn dòng thu được một cách riêng biệt và độc lập bằng cách tiến hành lại các bước (a) đến (h) trong (2), có thể thu được kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với kháng thể M30. Dùng làm một ví dụ về kháng thể này, kháng thể mà liên kết với cùng một epitop dùng làm kháng thể M30 có thể được minh họa. M30 nhận dạng epitop trong vùng IgC1 hoặc IgC2, mà là vùng trong vùng ngoại bào B7-H3, và liên kết với vùng IgC1 hoặc vùng IgC2 hoặc cả hai. Do đó, dùng làm epitop đối với kháng thể M30, cụ thể, epitop có mặt trong vùng IgC1 hoặc IgC2 của B7-H3 có thể là ví dụ minh họa. Nếu kháng thể đơn dòng được tạo ra mới liên kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc bậc ba riêng phần mà kháng thể M30 liên kết với, có thể xác định được là kháng thể đơn dòng liên kết với cùng một epitop dùng làm kháng thể M30. Ngoài ra, bằng cách khẳng định rằng kháng thể đơn dòng cạnh tranh với kháng thể M30 đối với quá trình liên kết với B7-H3 (đó là, kháng thể đơn dòng ức chế sự liên kết giữa kháng thể M30 và B7-H3), có thể xác định được rằng kháng thể đơn dòng liên kết với cùng một epitop như kháng thể M30 ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc của epitop đặc hiệu này chưa được xác định. Khi được khẳng định rằng kháng thể đơn dòng liên kết với cùng một epitop như kháng thể M30, kháng thể đơn dòng này rất được mong đợi là có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính của kháng thể M30.

(3) Các kháng thể khác

Kháng thể theo sáng chế bao gồm không chỉ các kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 được mô tả trên đây, mà còn kháng thể tái tổ hợp thu được bằng phương pháp biến đổi nhân tạo cho mục đích làm giảm tính kháng nguyên khác loại đối với con người như kháng thể khảm, kháng thể được làm giống người và kháng thể ở người. Các kháng thể này có thể được sản xuất sử dụng các phương pháp đã biết.

Đối với kháng thể khảm này, kháng thể mà trong đó các vùng biến đổi và

hằng định của kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác nhau, ví dụ, kháng thể khảm mà trong đó vùng biến đổi kháng thể có nguồn gốc từ chuột nhắt - hoặc chuột cống được kết nối với vùng hằng định có nguồn gốc từ người có thể là ví dụ minh họa (xem: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)). Kháng thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể kháng B7-H3 người của chuột nhắt M30 là kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà trình tự axit amin của nó bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 51 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà trình tự axit amin của nó bao gồm các gốc axit amin từ 23 đến 130 của SEQ ID NO: 53, và có thể có vùng hằng định bất kỳ có nguồn gốc từ người. Dùng làm ví dụ về kháng thể khảm này, kháng thể bao gồm chuỗi nặng mà trình tự axit amin của nó bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 471 của SEQ ID NO: 63 trong danh mục trình tự và chuỗi nhẹ mà trình tự axit amin của nó bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 233 của SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự có thể là ví dụ minh họa. Ngoài ra, trong trình tự chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 63 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 142 đến 471 là vùng hằng định. Hơn nữa, trong trình tự chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin này bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 129 đến 233 là vùng hằng định.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 63 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62 trong danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62 trong danh mục trình tự, trình tự nucleotit này bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể, trình tự nucleotit này bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, và trình tự nucleotit này bao gồm các nucleotit từ 424 đến 1413 mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể.

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58 trong danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58 trong danh mục trình tự, trình tự nucleotit này bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự nucleotit này bao gồm các nucleotit từ 61 đến

384 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, và trình tự nucleotit này bao gồm các nucleotit từ 385 đến 699 mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Dùng làm kháng thể được làm giống người này, kháng thể thu được chỉ bằng cách tích hợp vùng xác định hỗ trợ (CDR) vào trong kháng thể nguồn gốc từ người (xem tài liệu: Nature (1986) 321, pp. 522-525), và kháng thể thu được bằng cách ghép một phần các gốc axit amin của khung cũng như trình tự CDR với kháng thể ở người bằng phương pháp ghép CDR (WO 90/07861) có thể được dùng làm ví dụ minh họa.

Tuy nhiên, kháng thể được làm giống người có nguồn gốc từ kháng thể M30 không được giới hạn ở kháng thể đặc hiệu được làm giống người miễn sao kháng thể được làm giống người này có tất cả 6 kiểu trình tự CDR của kháng thể M30 và có hoạt tính chống ung thư. Ngoài ra, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể M30 có CDRH1 (NYVMH) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 92 trong danh mục trình tự, CDRH2 (YINPYNDDVKYNEKFKG) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 93 trong danh mục trình tự, và CDRH3 (WGYYGSPLYFFDY) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 94 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể M30 có CDRL1 (RASSRLIYMH) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 95 trong danh mục trình tự, CDRL2 (ATSNLAS) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 96 trong danh mục trình tự, và CDRL3 (QQWNSNPPT) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 97 trong danh mục trình tự.

Dùng làm ví dụ về kháng thể được làm giống người của kháng thể M30 chuột nhất, dạng kết hợp bất kỳ của chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự bất kỳ trong số (1) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 85, 87, 89, hoặc 91 trong danh mục trình tự, (2) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin (1) được mô tả trên đây, và (3) trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin trong trình tự axit amin (1) được mô tả trên đây bị mất, thay thế hoặc bổ sung và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự bất kỳ trong (4) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77, 79, 81, hoặc 83 trong danh mục trình tự, (5) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin (4) được mô tả trên đây, và (6) trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin trong trình tự axit amin (4) được mô tả trên đây bị mất, thay thế hoặc bổ sung có thể được dùng làm ví dụ minh họa.

Ngoài ra, thuật ngữ “một vài” như được sử dụng ở đây đề cập đến 1 đến 10, 1 đến 9, 1 đến 8, 1 đến 7, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, hoặc 1 hoặc 2.

Đối với phương pháp thay thế axit amin trong bản mô tả này, phương pháp thay thế axit amin bảo tồn là được ưu tiên. Phương pháp thay thế axit amin bảo tồn đề cập đến quá trình thế xảy ra trong nhóm axit amin liên quan đến các chuỗi nhánh axit amin. Các nhóm axit amin được ưu tiên là như sau: nhóm axit (axit aspartic và axit glutamic); nhóm bazơ (lysin, arginin, và histidin); nhóm không phân cực (alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, và tryptophan); và nhóm phân cực không tích điện (glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, và tyrosin). Các nhóm axit amin được ưu tiên hơn là như sau: nhóm hydroxy béo (serin và threonin); nhóm chứa amit (asparagin và glutamin); nhóm béo (alanin, valin, leuxin, và isoleuxin); và nhóm thơm (phenylalanin, tryptophan, và tyrosin). Việc thế axit amin này tốt hơn là được tiến hành trong nhóm mà không ảnh hưởng đến các tính chất của chất có trình tự axit amin gốc.

Đối với kháng thể mà có sự kết hợp được ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả trên đây, kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 71; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 73; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 75; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 77; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 79; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 81; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 83; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 71; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 73; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 75; và kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 77 có thể được minh họa.

Đối với kháng thể mà có sự kết hợp được ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả ở trên, kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 71;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 73;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 75;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 77;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 79;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 81;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 83;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 71;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 73;

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 75; và

kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong của SEQ ID NO: 77.

Hơn nữa, đối với kháng thể mà có sự kết hợp được ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mô tả ở trên, kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 73; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 77; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 79; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm

trình tự axit amin của SEQ ID NO: 81; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 83; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 73; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; và kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 77 có thể được minh họa.

Bằng cách kết hợp trình tự có độ tương đồng cao với trình tự axit amin của chuỗi nặng được mô tả trên đây với trình tự có độ tương đồng cao với trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được mô tả trên đây, có thể lựa chọn kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính của mỗi kháng thể được mô tả trên đây. Độ tương đồng thường là độ tương đồng 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn là độ tương đồng bằng 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là độ tương đồng bằng 95% hoặc lớn hơn, tốt nhất là độ tương đồng bằng 99% hoặc lớn hơn. Ngoài ra, bằng cách kết hợp trình tự axit amin trong đó một đến một vài gốc axit amin được thay thế, mất hoặc bổ sung trong trình tự axit amin chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, cũng có thể lựa chọn kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính của mỗi kháng thể được mô tả trên đây.

Độ đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định sử dụng các thông số mặc định của thuật toán Blast, phiên bản 2,2,2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, và David J. Lipman (1997), “Gapped BLAST và PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Thuật toán Blast cũng có thể được sử dụng thông qua Internet bằng cách truy cập địa chỉ 1334907992153_0.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 85, 87, 89 hoặc 91 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 142 đến 471 là vùng hằng định.

Hơn nữa, trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 71,

73, 75, 77, 79, 81 hoặc 83 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 129 đến 233 là vùng hằng định.

Các trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 85, 87, 89 hoặc 91 trong danh mục trình tự lần lượt được mã hóa bởi các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84, 86, 88 hoặc 90, trong danh mục trình tự. Ngoài ra, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 84 và 85 được thể hiện trong Fig.34, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 86 và 87 được thể hiện trong Fig.35, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 88 và 89 được thể hiện trong Fig.36, và các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 90 và 91 được thể hiện trong Fig.37. Trong mỗi trình tự nucleotit trên đây, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 423 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 424 đến 1413 mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể.

Các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77, 79, 81 hoặc 83 trong danh mục trình tự lần lượt được mã hóa bởi các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70, 72, 74, 76, 78, 80 hoặc 82, trong danh mục trình tự. Ngoài ra, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 70 và 71 được thể hiện trong Fig.27, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 72 và 73 được thể hiện trong Fig.28, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 74 và 75 được thể hiện trong Fig.29, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 76 và 77 được thể hiện trong Fig.30, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 78 và 79 được thể hiện trong Fig.31, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 80 và 81 được thể hiện trong Fig.32, và các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 82 và 83 được thể hiện trong Fig.33. Trong mỗi trình tự nucleotit nêu trên, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 mã hóa trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 384 mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 385 đến 699 mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Độ đồng nhất giữa trình tự bất kỳ trong các trình tự nucleotit này và trình tự nucleotit của kháng thể khác cũng có thể được xác định sử dụng thuật toán Blast.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể ở người mà liên kết

với cùng một epitop dưới dạng kháng thể M30. Kháng thể ở người kháng B7-H3 đề cập đến kháng thể ở người chỉ có trình tự gen của kháng thể có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể ở người. Kháng thể ở người kháng B7-H3 có thể thu được bằng phương pháp sử dụng chuột nhắt sản sinh kháng thể ở người có đoạn nhiễm sắc thể ở người bao gồm các gen chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể ở người (xem: Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic và Applied Aspects* vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. và Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, pp. 722-727, etc.).

Chuột nhắt sản sinh kháng thể ở người có thể được tạo ra một cách cụ thể như sau. Động vật được biến đổi gen mà trong đó các locut gen chuỗi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch nội sinh bị đứt đoạn, và để thay thế, các locut gen chuỗi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch ở người (human immunoglobulin heavy và light chain gene loci) được đưa vào thông qua vectơ nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC) hoặc các phương pháp tương tự được tạo ra bằng cách tạo ra động vật bị bất hoạt và động vật chuyển gen và giao phối cho các động vật này.

Ngoài ra, theo kỹ thuật ADN tái tổ hợp, bằng cách sử dụng các cADN mã hóa mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể ở người này, và tốt hơn là vektor chứa các cADN này, các tế bào có nhân điển hình được biến nạp, và tế bào thể biến nạp mà tạo ra kháng thể đơn dòng tái tổ hợp ở người được nuôi cấy, nhờ đó kháng thể cũng có thể thu được từ dịch nuôi cấy.

Ở đây, dùng làm vật chủ, ví dụ, các tế bào có nhân điển hình, tốt hơn là các tế bào động vật có vú như các tế bào CHO, các lympho bào, hoặc các tế bào u tủy có thể được sử dụng.

Ngoài ra, phương pháp thu được kháng thể người có nguồn gốc từ sự hiển thị thể thực khuẩn (a phage display-derived human antibody) được chọn từ thư viện kháng thể người (xem: Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics và Proteomics* (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.) là cũng đã biết.

Ví dụ, phương pháp hiển thị thể thực khuẩn mà trong đó vùng biến đổi của kháng thể ở người được biểu hiện trên bề mặt của thể thực khuẩn dưới dạng kháng

thể chuỗi đơn (scFv), và thể thực khuẩn mà liên kết với kháng thể được chọn lựa (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116) có thể được sử dụng.

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

Nếu trình tự ADN của scFv mà liên kết với kháng nguyên được xác định, kháng thể ở người có thể thu được bằng các tạo ra vector biểu hiện chứa trình tự này và đưa vector này vào trong vật chủ thích hợp để biểu hiện nó (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388, Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

Nếu kháng thể người mới được tạo ra liên kết với peptit riêng phần hoặc cấu trúc bậc ba riêng phần mà liên kết với kháng thể M30, có thể xác định được rằng kháng thể ở người liên kết với cùng một epitop dưới dạng kháng thể M30. Ngoài ra, bằng cách khẳng định rằng kháng thể ở người cạnh tranh với kháng thể M30 để liên kết với B7-H3 (đó là, kháng thể ở người ức chế sự liên kết giữa kháng thể M30 và B7-H3), có thể xác định được rằng kháng thể ở người liên kết với cùng một epitop dưới dạng kháng thể M30 ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc của epitop đặc hiệu này chưa được xác định. Khi được khẳng định rằng kháng thể ở người liên kết với cùng một epitop dưới dạng kháng thể M30, kháng thể ở người rất được mong đợi là có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính của kháng thể M30.

Các kháng thể khảm, kháng thể được làm giống người, hoặc kháng thể ở người thu được bằng các phương pháp được mô tả trên đây được đánh giá các tính chất liên kết kháng nguyên bằng phương pháp được thể hiện trong ví dụ 3 hoặc ví dụ tương tự, và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn.

Dùng làm ví dụ về chỉ số khác để sử dụng để so sánh các tính chất của các kháng thể, độ ổn định của các kháng thể này có thể được minh họa. Phép đo nhiệt lượng quét vi phân (DSC) là thiết bị có khả năng đo nhanh và chính xác nhiệt độ điểm giữa biến tính theo nhiệt độ (T_m) được dùng làm chỉ số mong muốn về độ ổn định cấu hình tương đối của các protein. Bằng cách đo các giá trị T_m sử dụng DSC và so sánh các giá trị này, sự khác nhau về độ ổn định nhiệt có thể được so sánh. Đã biết rằng, độ ổn định bảo quản của các kháng thể này có liên quan với độ ổn định nhiệt của kháng thể (Lori Burton, et. al., Pharmaceutical Development và

Technology (2007) 12, pp. 265-273), và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn bằng cách sử dụng độ ổn định nhiệt dùng làm chỉ số. Các ví dụ về các chỉ số khác để lựa chọn các kháng thể bao gồm các dấu hiệu sau: sản lượng trong tế bào chủ thích hợp là cao; và khả năng kết tụ trong dung dịch nước là thấp. Ví dụ, kháng thể mà thể hiện hiệu suất cao nhất không phải luôn luôn thể hiện độ ổn định nhiệt cao nhất, và do đó, cần thiết phải lựa chọn kháng thể thích hợp nhất để sử dụng cho người bằng cách thực hiện việc đánh giá chi tiết dựa trên các chỉ số được mô tả trên đây.

Ngoài ra, phương pháp mà trong đó các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ của kháng thể được liên kết sử dụng tác nhân liên kết thích hợp, nhờ đó thu được globulin miễn dịch mạch nhánh là cũng đã biết (Lee, H-S, et. al., *Molecular Immunology* (1999) 36, pp. 61-71; Shirmann, T. et. al., *mAbs* (2010), 2, (1) pp. 1-4). Bằng cách dimer hóa globulin miễn dịch mạch nhánh này, dimer thu được có thể có cấu trúc và hoạt tính tương tự với tính chất và hoạt tính của kháng thể mà là cấu trúc bậc bốn của nó. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể mà có vùng biến đổi chuỗi nặng đơn và không có trình tự chuỗi nhẹ. Kháng thể này được gọi là kháng thể vùng đơn (sdAb) hoặc thể nano, và trên thực tế, kháng thể này được quan sát trong lạc đà có bướu và lạc đà không bướu và đã được báo cáo là có ái lực liên kết với kháng thể (Muyldemans S. et. al., *Protein Eng.* (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et. al., *Nature* (1993) 363 (6428) 446-8). Các kháng thể được mô tả trên đây cũng có thể được hiểu là loại mảnh chức năng của kháng thể theo sáng chế.

Trong sáng chế, biến thể được biến đổi của kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này là cũng được bao gồm. Biến thể được biến đổi này đề cập đến biến thể thu được bằng đưa kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể của sáng chế trải qua quá trình biến đổi hóa học hoặc sinh học. Các ví dụ về biến thể được biến đổi hóa học bao gồm các biến thể được biến đổi về mặt hóa học bằng cách liên kết gốc hóa học với khung axit amin, các biến thể được biến đổi hóa học bằng mạch carbohydrat được liên kết với N hoặc liên kết với O, v.v.. Các ví dụ về biến thể được biến đổi sinh học bao gồm các biến thể thu được bằng cách biến đổi sau khi dịch mã (như glycosylat hóa liên kết N hoặc liên kết O, xử lý đầu tận cùng N hoặc C, khử amit, đồng phân hóa axit aspartic, hoặc oxy hóa methionin), và các biến thể mà trong đó gốc methionin được bổ sung vào đầu tận cùng N bằng cách biểu hiện trong tế bào chủ không có nhân điển hình.

Ngoài ra, kháng thể này được đánh dấu sao cho có thể phát hiện hoặc tách

được kháng thể hoặc kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ, kháng thể được đánh dấu bằng emzym, kháng thể được đánh dấu huỳnh quang, và kháng thể được đánh dấu ái lực là cũng được bao gồm trong ý nghĩa của kháng thể được biến đổi này. Biến thể được biến đổi của kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo sáng chế là hữu ích để cải thiện độ ổn định và duy trì máu của kháng thể ban đầu hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo sáng chế, làm giảm tính kháng nguyên của nó, phát hiện và phân lập kháng thể hoặc kháng nguyên, và v.v..

Ngoài ra, bằng cách điều hòa sự biến đổi của glycan mà được liên kết với kháng thể theo sáng chế (glycosyl hóa, tách fucosyl, v.v.), có thể làm tăng cường hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Dùng làm kỹ thuật điều hòa sự biến đổi glycan của kháng thể, WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, v.v. bộc lộ các kỹ thuật đã biết. Tuy nhiên, kỹ thuật là không bị giới hạn ở đó. Trong kháng thể và mảnh chức năng của kháng thể theo sáng chế, kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể mà trong đó sự biến đổi của glycan được điều hòa là cũng được bao gồm.

Trong trường hợp nếu kháng thể được tạo ra đầu tiên bằng cách phân lập gen kháng thể và sau đó đưa gen này vào vật chủ thích hợp, sự kết hợp của vật chủ thích hợp và vectơ biểu hiện thích hợp có thể được sử dụng. Các ví dụ cụ thể về gen kháng thể bao gồm dạng kết hợp của gen mã hóa trình tự chuỗi nặng của kháng thể và gen mã hóa trình tự chuỗi nhẹ của nó được mô tả trong bản mô tả này. Khi tế bào chủ được biến nạp, có thể chèn gen trình tự chuỗi nặng và gen trình tự chuỗi nhẹ vào trong cùng một vectơ biểu hiện, và cũng vào trong các vectơ biểu hiện khác nhau một cách riêng biệt.

Trong trường hợp nếu các tế bào có nhân điển hình được sử dụng làm vật chủ, các tế bào động vật, tế bào thực vật, và các vi sinh vật có nhân điển hình có thể được sử dụng. Dùng là các tế bào động vật này, các tế bào động vật có vú, ví dụ, các tế bào COS của khỉ (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), các nguyên bào sợi ở chuột NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và các chuỗi thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. và Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) của Tế bào buồng trứng chuột túi Trung Quốc (CHO cells; ATCC: CCL-61) có thể được dùng để minh họa.

Trong trường hợp nếu các tế bào chưa có nhân điển hình được sử dụng, ví dụ, *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* có thể được dùng làm ví dụ minh họa.

Bằng cách đưa gen của kháng thể mong muốn hoặc mảnh chức năng của kháng thể này vào trong các tế bào này thông qua quá trình biến nạp, và nuôi cấy tế bào được biến nạp thu được in vitro, kháng thể này có thể thu được. Trong phương pháp nuôi cấy được mô tả trên đây, hiệu suất đôi khi thay đổi phụ thuộc vào trình tự của kháng thể, và do đó, có thể lựa chọn kháng thể mà dễ dàng được tạo ra dưới dạng được phẩm bằng cách sử dụng hiệu suất làm chỉ số trong số các kháng thể có hoạt tính liên kết tương đương. Do đó, trong kháng thể và mảnh chức năng của kháng thể theo sáng chế, kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này, khác biệt ở chỗ bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp và bước thu gom kháng thể mong muốn hoặc mảnh chức năng của kháng thể này từ sản phẩm nuôi cấy thu được trong bước nuôi cấy này là cũng được bao gồm.

Ngoài ra, đã biết rằng gốc lysin ở đầu carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra trong tế bào động vật có vú được nuôi cấy bị khuyết (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), và cũng đã biết rằng hai gốc axit amin (glyxin và lysin) ở đầu carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể sinh ra trong tế bào động vật có vú được nuôi cấy là bị khuyết và gốc prolin mới ở vị trí của đầu carboxyl được amit hóa (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Tuy nhiên, sự khuyết đoạn và biến đổi của trình tự chuỗi nặng không ảnh hưởng đến ái lực liên kết kháng nguyên và chức năng cảm ứng (sự hoạt hóa của tế bào, sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, v.v.) của kháng thể. Do đó, trong sáng chế, kháng thể và mảnh chức năng của kháng thể này được trải qua quá trình biến đổi là cũng được bao gồm, và biến thể khuyết mà trong đó một hoặc hai axit amin bị khuyết ở đầu carboxyl của chuỗi nặng, biến thể thu được bằng cách amit hóa biến thể khuyết này (ví dụ, chuỗi nặng mà trong đó gốc prolin đầu carboxyl được amit hóa), và tương tự có thể được dùng làm ví dụ minh họa. Loại biến thể khuyết này khuyết ở đầu carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế không chỉ giới hạn ở các biến thể nêu trên miễn sao ái lực liên kết kháng nguyên và chức năng cảm ứng được bảo tồn. Hai chuỗi nặng cấu thành kháng thể theo sáng chế có thể thuộc một loại được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và biến thể khuyết được mô tả trên đây, hoặc có thể là hai loại ở dạng kết hợp được chọn từ chúng. Tỷ lệ lượng của mỗi biến thể khuyết có thể bị ảnh hưởng bởi loại các tế bào động vật có vú được nuôi cấy mà tạo ra kháng thể theo sáng chế và các điều kiện nuôi cấy, tuy nhiên, trường hợp nếu một gốc axit amin ở đầu carboxyl bị khuyết trong cả hai chuỗi nặng được bao gồm dưới dạng các thành phần chính trong kháng thể theo sáng chế có thể được dùng làm ví dụ

minh họa. Không có giới hạn về kiểu tương đương của kháng thể theo sáng chế, và các ví dụ của chúng bao gồm IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD, và IgE, và các ví dụ được ưu tiên của chúng bao gồm IgG và IgM, và các ví dụ được ưu tiên hơn nữa của chúng bao gồm IgG1 và IgG2.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể là mảnh chức năng của kháng thể này có vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể hoặc đoạn được biến đổi của nó. Đoạn của kháng thể này có thể thu được bằng cách xử lý kháng thể với proteaza như papain hoặc pepsin, hoặc biến đổi gen kháng thể bằng kỹ thuật di truyền và biểu hiện gen được biến đổi này trong các tế bào nuôi cấy thích hợp. Trong số các đoạn kháng thể này, đoạn có tất cả hoặc một phần các chức năng của kháng thể có thể được gọi là mảnh chức năng của kháng thể này.

Đối với các chức năng của kháng thể, hoạt tính liên kết kháng nguyên nói chung, hoạt tính trung hòa hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính tăng cường hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) có thể dùng làm ví dụ minh họa. Chức năng của kháng thể và mảnh chức năng của kháng thể này theo sáng chế là hoạt tính liên kết với B7-H3, tốt hơn là hoạt tính của thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), tốt hơn nữa là hoạt tính gây độc tế bào (hoạt tính chống ung thư) qua trung gian hoạt tính ADCP kháng các tế bào khối u. Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể có hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC bên cạnh hoạt tính ADCP. Cụ thể, đã được báo cáo rằng dược phẩm chứa kháng thể chống khối u hiện có tác dụng trực tiếp lên các tế bào khối u để phong bế tín hiệu tăng sinh, tác dụng trực tiếp lên các tế bào khối u để cảm ứng tín hiệu chết tế bào, hạn chế sự phát triển mạch, gây ra hoạt tính ADCC được trung gian bởi các tế bào NK, và gây ra hoạt tính CDC được trung gian bởi bổ thể, nhờ đó hạn chế được sự phát triển của các tế bào khối u (J Clin Oncol 28: 4390-4399. (2010), Clin Cancer Res; 16 (1); 11-20. (2010)), tuy nhiên, ít nhất các tác giả sáng chế không ý thức được rằng hoạt tính ADCP của kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế của đơn này đã được báo cáo dưới dạng hoạt tính của dược phẩm chứa kháng thể chống khối u hiện có.

Các ví dụ về đoạn của kháng thể bao gồm Fab, F(ab')₂, Fv, Fv chuỗi đơn (scFv) mà trong đó các phân tử Fv của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết qua tác nhân liên kết thích hợp, diabody (các diabody), kháng thể tuyến tính, và kháng thể đa đặc hiệu chứa đoạn kháng thể này. Ngoài ra, Fab' mà là đoạn hóa trị một trong vùng biến đổi của kháng thể thu được bằng cách xử lý F(ab')₂ dưới các điều kiện khử là

cũng được bao gồm trong đoạn của kháng thể.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa đặc hiệu với tính đặc hiệu đối với ít nhất hai loại kháng nguyên khác nhau. Nhìn chung, kháng thể này liên kết với hai loại kháng nguyên (tức là, kháng thể đặc hiệu kép), tuy nhiên, “kháng thể đa đặc hiệu” như được sử dụng ở đây bao gồm kháng thể có tính đặc hiệu đối với hai hoặc nhiều (ví dụ, ba) loại kháng nguyên.

Kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế có thể là kháng thể độ dài đầy đủ hoặc đoạn của kháng thể này (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép F(ab')₂). Kháng thể đặc hiệu kép này có thể được tạo ra bằng cách liên kết các chuỗi nặng và nhẹ (cặp HL) của hai loại kháng thể, hoặc cũng có thể được tạo ra bằng cách dung hợp các tế bào lai mà tạo ra các kháng thể đơn dòng để điều chế các tế bào được dung hợp sản sinh kháng thể đặc hiệu kép (Millstein et al., *Nature* (1983) 305, pp. 537-539).

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể chuỗi đơn (cũng được gọi là scFv). Kháng thể chuỗi đơn có thể thu được bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể thông qua tác nhân liên kết polypeptit (Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113 (được chỉnh sửa bởi Rosenberg và Moore), Springer Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), *Nature Biotechnology* (2005), 23, pp. 1126-1136). Ngoài ra, đoạn BiscFv được tạo ra bằng cách liên kết hai phân tử scFv thông qua tác nhân liên kết polypeptit có thể được dùng làm kháng thể đặc hiệu kép.

Phương pháp sản xuất kháng thể chuỗi đơn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, US 4946778, 5260203, 5091513, 5455030, v.v.). Trong scFv này, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nối với nhau thông qua tác nhân liên kết mà không tạo ra thể tiếp hợp, tốt hơn là thông qua tác nhân liên kết polypeptit (Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988), 85, pp. 5879-5883). Trong scFv này, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể có nguồn gốc từ cùng kháng thể hoặc các kháng thể khác nhau.

Khi tác nhân liên kết polypeptit được sử dụng để kết nối các vùng biến đổi, ví dụ, peptit chuỗi đơn đã cho bao gồm 12 đến 19 gốc được sử dụng.

ADN mã hóa scFv có thể thu được bằng cách tiến hành khuếch đại thông qua PCR sử dụng ADN dùng làm khuôn mà bao gồm toàn bộ hoặc phần mong muốn của ADN được chọn từ ADN mã hóa chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng của

kháng thể được mô tả trên đây và ADN mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó và cũng sử dụng cặp đoạn môi mà xác định cả hai đầu của ADN khuôn, và tiếp tục tiến hành khuếch đại bằng cách kết hợp ADN mã hóa phân polypeptit của tác nhân liên kết và cặp đoạn môi mà xác định cả hai đầu của polypeptit để kết nối hai đầu này của nó với mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Ngoài ra, khi ADN mã hóa scFv được tạo ra, vector biểu hiện bao gồm nó và vật chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện có thể thu được bằng các phương pháp thông thường. Hơn nữa, bằng cách sử dụng vật chủ thu được, scFv có thể thu được bằng các phương pháp thông thường. Đoạn kháng thể của nó có thể được tạo ra trong vật chủ bằng cách thu được gen và biểu hiện gen này bằng phương pháp tương tự như được mô tả trên đây.

Kháng thể theo sáng chế được làm đa dạng để làm tăng ái lực của nó đối với kháng nguyên. Kháng thể được làm đa dạng có thể là một loại kháng thể hoặc nhiều kháng thể mà nhận diện được nhiều epitop của cùng kháng nguyên. Dùng làm phương pháp làm đa dạng của kháng thể, phương pháp liên kết vùng IgG CH3 với hai phân tử scFv, liên kết với streptavidin, đưa motif vòng xoắn, và các phương pháp tương tự có thể được sử dụng để minh họa.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa dòng mà là hỗn hợp của nhiều loại kháng thể kháng B7-H3 có các trình tự axit amin khác nhau. Dùng làm ví dụ về kháng thể đa dòng, hỗn hợp của nhiều loại kháng thể có CDR khác nhau có thể được sử dụng để minh họa. Đối với kháng thể đa dòng này, kháng thể thu được bằng nuôi cấy hỗn hợp của các tế bào mà tạo ra các kháng thể khác nhau và sau đó tinh chế các kháng thể này từ môi trường nuôi cấy thu được có thể được sử dụng (xem: WO 2004/061104).

Dùng làm kháng thể được biến đổi, kháng thể được liên kết với các loại phân tử khác nhau như polyetylen glycol (PEG) cũng có thể được sử dụng.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể ở dạng tiếp hợp được tạo ra giữa các kháng thể bất kỳ và tác nhân điều trị khác (tiếp hợp miễn dịch). Các ví dụ về kháng thể bao gồm tiếp hợp mà trong đó kháng thể được tiếp hợp với vật liệu hoạt tính phóng xạ hoặc hợp chất có tác dụng dược lý (Nature Biotechnology (2005) 23, pp. 1137-1146). Các ví dụ về chúng bao gồm indi (^{111}In)-capromab pendetide, techneti ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)-nofetumomab merpentan, indi (^{111}In)-ibritumomab, yttri (^{90}Y)-ibritumomab, và iot (^{131}I)-tositumomab.

Kháng thể thu được có thể được tinh chế tới độ đồng nhất. Việc tách và tinh chế kháng thể có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp tách và tinh chế protein thông thường. Ví dụ, kháng thể có thể được tách và tinh chế bằng cách lựa chọn và kết hợp một cách thích hợp phương pháp sắc ký cột, lọc độ chuẩn, siêu lọc, kết tủa muối, thẩm tách, điện di gel polyacrylamit điều chế, điện di điều tiêu tĩnh điện, và phương pháp tương tự (Strategies for Protein Purification và Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Kháng thể: A Laboratory Manual. Ed Harlow và David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), nhưng phương pháp là không chỉ giới hạn ở đó.

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

Phương pháp sắc ký này có thể được tiến hành sử dụng sắc ký lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Dùng làm cột được sử dụng trong phương pháp sắc ký ái lực, cột protein A và cột protein G có thể được sử dụng làm ví dụ minh họa. Ví dụ, dùng làm cột sử dụng cột protein A, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) và cột tương tự có thể được sử dụng làm ví dụ minh họa.

Hơn nữa, bằng cách sử dụng chất mang có kháng thể được làm bất hoạt trên đó, kháng thể cũng có thể được tinh chế sử dụng đặc tính liên kết của kháng thể với kháng nguyên.

3. Dược phẩm chứa kháng thể kháng B7-H3

Các kháng thể này thu được bằng phương pháp được mô tả trong mục “2. Sản xuất của kháng thể kháng B7-H3” nêu trên thể hiện hoạt tính gây độc tế bào kháng các tế bào ung thư, và do đó có thể được dùng làm dược phẩm, cụ thể là tác nhân điều trị và/hoặc tác nhân phòng ngừa ung thư.

Hoạt tính gây độc tế bào được thể hiện bởi kháng thể in vitro có thể được xác định bằng cách đo hoạt tính ức chế sự sinh trưởng của tế bào.

Ví dụ, dòng tế bào ung thư mà biểu hiện quá mức B7-H3 được nuôi cấy, kháng thể được bổ sung vào hệ nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau, và hoạt tính ức chế bất kỳ chống lại sự tạo thành tập trung (focus formation), sự tạo thành khuẩn lạc,

và sự sinh trưởng tạo hình cầu có thể được đo.

Hiệu quả điều trị *in vivo* của kháng thể lên bệnh ung thư sử dụng động vật thử nghiệm có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể để chuột nhắt được cạo lông được cấy dòng tế bào ung thư mà biểu hiện quá mức B7-H3 và đánh giá sự thay đổi bất kỳ trong các tế bào ung thư.

Các ví dụ về loại ung thư bao gồm ung thư phổi, ung thư thận, canxinom đường tiết niệu, ung thư kết trực tràng, ung thư tiền liệt tuyến, u tế bào thần kinh đệm đa dạng, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, ung thư vú, u hắc sắc tố, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, và ung thư thực quản, tuy nhiên, loại ung thư không chỉ giới hạn ở đó miễn sao tế bào ung thư cần xử lý biểu hiện B7-H3.

Các chất chấp nhận được để được sử dụng trong phương pháp bào chế được phẩm theo sáng chế tốt hơn là các chất không độc đối với cá thể mà được phẩm được sử dụng về cả liều lượng và nồng độ.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất dùng cho dược phẩm mà có thể làm thay đổi hoặc duy trì độ pH, áp suất thẩm thấu, độ nhớt, độ truyền qua, màu sắc, tính đẳng trương, điều kiện vô khuẩn, độ ổn định, độ tan, tốc độ giải phóng, tốc độ hấp thụ, và độ thẩm thấu của nó. Các ví dụ về chất dùng trong dược phẩm này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin như glyxin, alanin, glutamin, asparagin, arginin, và lysin; các chất kháng khuẩn; các chất chống oxy hóa như axit ascorbic, natri sulfat, và natri hydro sulfít; các chất đệm như phosphat, xitrat, đệm borat, natri hydro cacbonat, và dung dịch Tris-HCl; các chất độn như manitol và glyxin; chất tạo chelat như etylendiamin tetraaxetat (EDTA); các chất tạo phức như cafein, polyvinylpyrolidin, β -cyclodextrin, và hydroxypropyl- β -cyclodextrin; các chất giãn nở như glucoza, manosa, và dextrin; các carbohydrat khác như monosacarit và disacarit; chất tạo màu; chất tạo hương; chất pha loãng; chất nhũ hóa; polyme ưa nước như polyvinylpyrolidin; chất bảo quản như các polypeptit trọng lượng phân tử thấp, các ion trái dấu tạo muối, benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salixylic, thimerosal, phenetyl alcohol, metylparaben, propylparaben, clohexidin, axit sorbic, và hydro peroxit; các dung môi như glyxerin, propylen glycol, và polyetylen glycol; các rượu đường như manitol và sorbitol; các chất tạo huyền phù; các chất hoạt động bề mặt như sorbitan este, các polysorbat bao gồm polysorbate 20 và polysorbate 80, Triton, tromethamin, lecithin, và cholesterol; chất cải thiện độ ổn định như sucroza và sorbitol; các chất làm tăng độ đàn hồi như natri clorua, kali clorua, và manitol và sorbitol; các chất vận chuyển; các tá dược; và/hoặc các chất

phụ trợ dược phẩm. Lượng của các chất dùng trong dược phẩm này tốt hơn là từ 0,001 đến 100 lần, cụ thể tốt hơn là từ 0,1 đến 10 lần trọng lượng của kháng thể kháng B7-H3. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định một cách thích hợp công thức bào chế dược ưu tiên của dược phẩm trong quy trình bào chế phụ thuộc vào bệnh mà chế phẩm này được sử dụng, đường dùng sử dụng, hoặc các yếu tố tương tự.

Tá dược hoặc chất mang trong dược phẩm có thể ở dạng chất lỏng hoặc chất rắn. Tá dược hoặc chất mang thích hợp có thể là nước có thể tiêm, nước muối sinh lý, dịch não thủy nhân tạo, hoặc chất khác được sử dụng phổ biến ngoài đường tiêu hóa. Ngoài ra, nước muối sinh lý trung tính hoặc nước muối sinh lý chứa albumin huyết thanh có thể được dùng làm chất mang. Dược phẩm có thể chứa dung dịch đệm Tris có pH 7,0 đến 8,5, dung dịch đệm axetat có pH 4,0 đến 5,5, hoặc dung dịch đệm xitrat có pH 3,0 đến 6,2. Ngoài ra, dung dịch đệm này có thể được bổ sung sorbitol hoặc hợp chất khác.

Các ví dụ về dược phẩm theo sáng chế bao gồm dược phẩm chứa kháng thể kháng B7-H3 và dược phẩm chứa kháng thể kháng B7-H3 và ít nhất một tác nhân điều trị ung thư. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng sản phẩm được làm đông khô lạnh hoặc chất lỏng dùng làm tác nhân điều trị có thành phần được chọn và độ tinh khiết đạt yêu cầu. Dược phẩm chứa kháng thể kháng B7-H3 và dược phẩm chứa kháng thể kháng B7-H3 và ít nhất một tác nhân điều trị ung thư cũng có thể được tạo thành sản phẩm được làm đông khô lạnh sử dụng tá dược thích hợp như sucroza.

Trong chế phẩm được mô tả trên đây, tác nhân điều trị ung thư được kết hợp cùng với kháng thể kháng B7-H3 có thể được sử dụng đồng thời với, riêng rẽ, hoặc lần lượt với kháng thể kháng B7-H3, hoặc tác nhân điều trị và kháng thể kháng B7-H3 có thể được sử dụng ở các khoảng liều lượng khác nhau. Các ví dụ về tác nhân điều trị bệnh ung thư này bao gồm abraxan, carboplatin, cisplatin, gemcitabin, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastin, và các tác nhân được mô tả trong WO 2003/038043, và các ví dụ về chúng bao gồm các chất tương tự LH-RH (như leuprorelin và goserelin), estramustine phosphat, các chất đối kháng estrogen (như tamoxifen và raloxifen), và các chất ức chế aromataza (như anastrozol, letrozol, và exemestan), tuy nhiên, tác nhân này không chỉ giới hạn ở đó miễn sao tác nhân này là tác nhân điều trị có hoạt tính chống ung thư.

Cá thể mà dược phẩm được sử dụng là không bị giới hạn cụ thể, tuy nhiên,

được ưu tiên là động vật có vú, và được ưu tiên hơn là người.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa hoặc để hấp thụ trong dạ dày-ruột non thông qua đường dùng qua đường miệng. Thành phần và hàm lượng của chế phẩm có thể được xác định phụ thuộc vào phương pháp sử dụng. Ái lực của kháng thể kháng B7-H3 được chứa trong dược phẩm theo sáng chế đối với B7-H3 càng cao, thì hằng số phân ly (giá trị K_d) của nó đối với B7-H3 càng thấp, kháng thể kháng B7-H3 mạnh hơn có thể ức chế hiệu quả của thuốc ngay cả khi giảm liều dùng cho người. Do đó, liều dùng của dược phẩm theo sáng chế cho người cũng có thể được xác định dựa trên kết quả này. Đối với liều dùng này, trong trường hợp nếu kháng thể kháng B7-H3 người được sử dụng cho người, kháng thể có thể được sử dụng ở liều dùng từ khoảng 0,001 đến 100 mg/kg trong một hoặc một vài lần trong khoảng từ 1 đến 180 ngày. Các ví dụ về dạng liều dùng của dược phẩm theo sáng chế bao gồm thuốc tiêm chứa dịch tiêm truyền, thuốc đạn, tác nhân dùng qua mũi, tác nhân dùng dưới lưỡi, và các chất hấp thụ qua da.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ, tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Lưu ý rằng các thao tác tương ứng liên quan đến kỹ thuật gen trong các ví dụ sau đây được tiến hành theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu "Tách dòng phân tử" (của tác giả Sambrook, J., Fritsch, E. F. và Maniatis, T., công bố bởi Cold Spring Harbor Laboratory Press năm 1989), hoặc trong trường hợp của sử dụng các chất phản ứng hoặc kit có bán trên thị trường, chúng được sử dụng theo chỉ dẫn được gắn kèm theo, trừ phi có quy định khác.

Ví dụ 1. Sản xuất plasmit

1)-1 Sản xuất vector biểu hiện B7-H3 ở người

1)-1-1 Sản xuất vector biểu hiện đối với biến thể 1 của B7-H3 ở người có chiều dài đầy đủ

Phản ứng PCR được tiến hành sử dụng cADN tổng hợp được từ toàn bộ ARN của các tế bào LNCaP (American Type Culture Collection (ATCC)) dùng làm khuôn và cũng sử dụng bộ đoạn mồi sau, nhờ đó làm khuếch đại cADN mã hóa biến thể 1 của B7-H3 ở người:

Đoạn mồi 1:

5'-ctatagggagacccaagctggctagcatgctgcgtcggcggggcag-3' (SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự); và

Đoạn mồi 2:

5'-aacggggccctctagactcgagcgccgctcaggctatttcttgccatcatcttcttgctgtcag-3' (SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự).

Sau đó, sản phẩm PCR thu được được tinh chế sử dụng MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO, Co., Ltd.). Sau đó, sản phẩm PCR được phân giải bằng enzyme giới hạn (NheI và NotI), sau đó bằng cách tinh chế sử dụng MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO, Co., Ltd.). ADN plasmid pcDNA3.1(+) được phân giải bằng enzym giới hạn tương tự (NheI và NotI), sau đó bằng cách tinh chế sử dụng MagExtractor PCR & Gel cleanup (TOYOBO, Co., Ltd.).

Dung dịch chứa ADN tinh khiết thu được được trộn, và ngoài ra, Ligation high (TOYOBO, Co., Ltd.) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp thu được được ủ ở 16°C trong 8 giờ để gắn hiệu quả. Hỗn hợp phản ứng thu được được bổ sung vào các tế bào khả biến E. coli DH5α (Invitrogen Corporation) để biến nạp hiệu quả.

PCR định hướng khuôn lạc được tiến hành trên khuôn lạc thu được sử dụng các đoạn mồi PCR và đoạn mồi đảo BGH, và dòng có thể chọn được lựa chọn.

Dòng có thể chọn thu được được nuôi cấy trong môi trường lỏng (LB/Amp), và ADN plasmid được tách sử dụng MagExtractor -Plasmid- (TOYOBO, Co., Ltd.).

Bằng cách sử dụng ADN plasmid thu được dùng làm khuôn, trình tự giữa đoạn mồi 3 và đoạn mồi 4 sau được xác định bằng cách phân tích trình tự và các trình tự được so sánh giữa dòng thu được và trình tự CDS được tạo ra:

Đoạn mồi 3 (đoạn mồi yếu tố khởi đầu CMV):

5'-cgcaaatgggcggtaggcgtg-3' (SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự); và

Đoạn mồi 4 (đoạn mồi đảo BGH):

5'-tagaaggcacagtcgagg-3' (SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự).

Sau khi xác nhận trình tự, dòng thu được được nuôi cấy trong 200 ml môi

trường LB/Amp, và ADN plasmit được tách ra sử dụng Plasmid Midi V-100 kit (VioGene, Inc.).

Do đó vector thu được được đặt tên là “pcDNA3,1-B7-H3”. Trình tự của vùng ORF của biến thể 1 của gen B7-H3 được tách dòng trong vector này có số nucleotit từ 1 đến 1602 trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự axit amin của biến thể 1 của B7-H3 được nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự.

1)-1-2 Sản xuất vector biểu hiện đối với biến thể 2 của B7-H3 ở người có độ dài đầy đủ

PCR được tiến hành sử dụng cADN tổng hợp được từ toàn bộ ARN của các tế bào LNCaP dùng làm khuôn và cũng sử dụng bộ đoạn mỗi sau, nhờ đó khuếch đại được cADN mã hóa biến thể 2 của B7-H3 ở người:

Đoạn mỗi 5

5'-ggggacaagtttgtacaaaaagcaggcttcaccatgctgcgtcggcggggcagccctg-3' (SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự)

Đoạn mỗi 6

5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcggctatttctgt-3' (SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự).

Việc tinh chế được tiến hành bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 1)-1-1, và sản phẩm PCR sau khi tinh chế được hợp nhất vào trong vector pDONR221 (Invitrogen Corporation) bằng phản ứng Gateway BP, nhờ đó biến nạp E. coli TOP10 (Invitrogen Corporation).

Đối với các dòng thu được sau khi biến nạp, kích thước của đoạn xen được khẳng định bằng cách PCR khuôn lạc. Đối với 8 dòng mà trong đó kích thước của đoạn xen được khẳng định, trình tự ADN ở đầu 3' và đầu 5' của đoạn xen được khẳng định bằng cách tiến hành phản ứng xác định trình tự từ phía vector đến phía đoạn xen đối với cả hai đầu. Phản ứng Gateway LR giữa dòng đầu vào mà trình tự của nó đã được khẳng định và vector đích Gateway pcDNA-DEST40 (Invitrogen Corporation) được tiến hành. Đối với dòng thu được sau khi biến nạp E. coli TOP10, kích thước của đoạn xen được khẳng định bằng cách PCR khuôn lạc. Đối với dòng mà kích thước của đoạn xen được khẳng định, trình tự ADN ở đầu 3' và đầu 5' của

đoạn xen được phân tích để khẳng định rằng đoạn chèn ưa thích được chèn vào một cách chính xác. Ít nhất 1 mg plasmid thu được của dòng này được tinh chế sử dụng PureLink HiPure Plasmid Megaprep Kit (Invitrogen Corporation).

Do đó vector thu được được đặt tên là “biến thể 2 của pcDNA-DEST40-B7-H3”. Trình tự của vùng ORF của gen biến thể 2 của B7-H3 được tách dòng trong vector này có số nucleotit từ 1 đến 948 trong SEQ ID NO: 9 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự axit amin của biến thể 2 của B7-H3 được nêu trong SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự.

1)-2 Sản xuất vector biểu hiện đối với protein riêng phần của B7-H3

Bằng cách sử dụng plasmit có độ dài đầy đủ của B7-H3 liên quan đến biến thể 1 của B7-H3 của ví dụ 1)-1-1 dùng làm khuôn, mỗi vùng sau được khuếch đại bằng PCR. Các số này thể hiện mỗi vùng ưa thích tương ứng với số nucleotit của B7-H3 được nêu trong SEQ ID NO: 5. Đoạn môi được thiết kế để chứa codon kết thúc ở đầu 3' bên cạnh trình tự Gateway att.

Mỗi vùng sau 1), 2), và 3) được tạo ra bằng cách khuếch đại hai vùng và sau đó liên kết các vùng này bằng PCR để tạo ra một đoạn. Tức là, đối với vùng 1), việc khuếch đại được tiến hành sử dụng các đoạn môi 7 và 12, và các đoạn môi 15 và 11, và các sản phẩm PCR thu được được tiếp tục khuếch đại sử dụng các đoạn môi 7 và 11. Đối với vùng 2), việc khuếch đại được tiến hành sử dụng các đoạn môi 8 và 13, và các đoạn môi 15 và 11, và các sản phẩm PCR thu được được tiếp tục khuếch đại sử dụng các đoạn môi 8 và 11. Đối với vùng 3), việc khuếch đại được tiến hành sử dụng các đoạn môi 9 và 14, và các đoạn môi 15 và 11, và các sản phẩm PCR thu được được tiếp tục khuếch đại sử dụng các đoạn môi 9 và 11. Đối với vùng 4), việc khuếch đại được tiến hành sử dụng các đoạn môi 10 và 11. Đối với vùng 5), việc khuếch đại được tiến hành sử dụng các đoạn môi 8 và 11. Đối với vùng 6), việc khuếch đại được tiến hành sử dụng các đoạn môi 9 và 11.

Các vùng ưa thích

- 1) biến thể 1 của B7-H3 ORF: 79-417 và 1369-1602 (573 bp)
- 2) biến thể 1 của B7-H3 ORF: 418-732 và 1369-1602 (549 bp)
- 3) biến thể 1 của B7-H3 ORF: 733-1071 và 1369-1602 (573 bp)
- 4) biến thể 1 của B7-H3 ORF: 1072-1602 (531 bp)

5) biến thể 1 của B7-H3 ORF: 418-1602 (1185 bp)

6) biến thể 1 của B7-H3 ORF: 733-1602 (870 bp)

Số đoạn môi và trình tự bazơ

Đoạn môi 7

5'-ggggacaagtttgtagaaaaagcaggcttcggagccctggaggtccaggtc-3' (SEQ ID NO: 11 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 8

5'-ggggacaagtttgtagaaaaagcaggcttcgctccctactcgaagcccagcatg-3' (SEQ ID NO: 12 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 9

5'-ggggacaagtttgtagaaaaagcaggcttcggagccgtggaggtccaggtc-3' (SEQ ID NO: 13 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 10

5'-ggggacaagtttgtagaaaaagcaggcttcgctccctactcgaagcccagcatg-3' (SEQ ID NO: 14 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 11

5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcaggctatttctgtccatcatc-3' (SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 12

5'-gggaatgtcataggctgcccggccacctgcaggctgacggcag-3' (SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 13

5'-gggaatgtcataggctgccctgtggggcttctctggggtgtg-3' (SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 14

5'-gggaatgtcataggctgcccggccacctgcaggctgacggcag-3' (SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 15

5'-gggcagcctatgacattccccccagag-3' (SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự)

Việc tinh chế được tiến hành bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 1)-1-1, và mỗi một sản phẩm được khuếch đại sau khi tinh chế được hợp nhất vào trong vector pDONR221 bằng phản ứng Gateway BP, do đó biến nạp E. coli TOP10. Đối với các dòng thu được sau khi biến nạp, kích thước của đoạn xen được khẳng định bằng cách PCR khuôn lạc.

Đối với mỗi dòng mà trong đó kích thước của đoạn xen được khẳng định, trình tự ADN ở đầu 3' và đầu 5' của đoạn xen được khẳng định bằng cách tiến hành phản ứng xác định trình tự từ phía vector đến phía đoạn chèn đối với cả hai đầu.

Đối với các dòng mà được khẳng định có đoạn chèn ưa thích, toàn bộ trình tự ADN của đoạn xen cũng được khẳng định sử dụng các đoạn môi sau. Kết quả của phép phân tích trình tự, đã khẳng định được rằng toàn bộ các trình tự là giống với thông tin của các trình tự ưa thích.

Phản ứng Gateway LR giữa mỗi dòng đầu vào mà trình tự của nó được khẳng định và pFLAG-myc-CMV-19-DEST (Invitrogen Corporation) được tiến hành. Đối với các dòng thu được sau khi biến nạp E. coli DH10B (Invitrogen Corporation), kích thước của đoạn xen được khẳng định bằng cách PCR khuôn lạc.

Đối với mỗi dòng mà trong đó kích thước của đoạn xen được khẳng định, trình tự ADN ở đầu 3' và đầu 5' của đoạn xen được phân tích để khẳng định rằng đoạn xen ưa thích được xen vào chính xác. Dưới đây, các vector biểu hiện thu được bằng cách hợp nhất mỗi vùng 1) đến 6) nêu trên được thể hiện lần lượt dưới dạng "B7-H3 IgV1", "B7-H3 IgC1", "B7-H3 IgV2", "B7-H3 IgC2", "B7-H3 IgC1-V2-C2", và "B7-H3 IgV2-C2".

Các trình tự nucleotit của các vùng ORF của các gen B7-H3 IgV1, B7-H3 IgC1, B7-H3 IgV2, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2, và B7-H3 IgV2-C2, mỗi trong chúng được tách dòng trong vector này, được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28, và 30 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, các trình tự axit amin của B7-H3 IgV1, B7-H3 IgC1, B7-H3 IgV2, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2, và B7-H3

IgV2-C2 lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 21, 23, 25, 27, 29, và 31, trong danh mục trình tự. Ngoài ra, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 20 và 21 được thể hiện trong Fig.15, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 22 và 23 được thể hiện trong Fig.16, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 24 và 25 được thể hiện trong Fig.17, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 26 và 27 được thể hiện trong Fig.18, các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 28 và 29 được thể hiện trong Fig.19, và các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 30 và 31 được thể hiện trong Fig.20.

1)-3 Sản xuất các vector biểu hiện đối với gen họ B7

pCMV6-XL-4-B7RP-1, pCMV6-XL-4-B7-H1, và pCMV6-XL-4-B7-DC (mà là các vector biểu hiện gen thu được bằng hợp nhất mỗi B7RP-1, B7-H1, và B7-DC (mà là các gen họ B7) vào trong vector biểu hiện pCMV6-XL-4) tất cả được mua từ OriGene, Inc.

Các vector biểu hiện mỗi CD80, CD86, và B7-H4, mà là các gen họ B7, được tạo ra như sau.

pENTR/221-CD80, pENTR/221-CD86, và pENTR/221-B7-H4, mà là các dòng thu được bằng cách hợp nhất mỗi CD80, CD86, và B7-H4 trong vector đầu vào pENTR/221, được mua từ Invitrogen Corporation

Phản ứng Gateway LR giữa mỗi dòng đầu vào mà trình tự của nó được khẳng định và pcDNA3,1-DEST (Invitrogen Corporation) được tiến hành. Đối với các dòng thu được sau khi biến nạp E. coli DH10B, kích thước của đoạn xen được khẳng định bằng cách PCR khuôn lạc. Đối với mỗi dòng mà trong đó kích thước của đoạn xen được khẳng định, trình tự ADN ở đầu 3' và đầu 5' của đoạn xen được phân tích để khẳng định rằng đoạn xen ưa thích được xen vào chính xác.

Các trình tự nucleotit của các vùng ORF của gen B7RP-1, B7-H1, B7-DC, CD80, CD86, và B7-H4, mỗi loại trong số chúng được tách dòng trong vector này, lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, và 42, trong danh mục trình tự. Ngoài ra, các trình tự axit amin của B7RP-1, B7-H1, B7-DC, CD80, CD86, và B7-H4 lần lượt được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41, và 43, trong danh mục trình tự.

Ví dụ 2. Sản xuất kháng thể đơn dòng và sàng lọc kháng thể

2)-1 Gây miễn dịch

Chuột nhắt BALB/cAnNCrIcrlj (Charles River Laboratories Japan, Inc.), chuột nhắt FcγRII KO (Taconic, Inc., IBL Co., Ltd.), hoặc chuột nhắt GANP (Transgenic, Inc.) ở 4 đến 6 tuần tuổi được sử dụng. Vào ngày 0, 7, 15, và 24, các tế bào LNCaP, các tế bào MCF7 (ATCC) hoặc các tế bào AsPC1 (ATCC) được tách bằng versen (Invitrogen Corporation) được sử dụng dưới cho vùng dưới da của mỗi con chuột nhắt ở liều dùng bằng 5×10^6 tế bào/chuột nhắt. Vào ngày thứ 31, các tế bào tương tự được sử dụng dưới da cho mỗi con chuột nhắt ở liều dùng bằng 5×10^6 tế bào. Vào ngày thứ 34, lách được tách ra từ mỗi con chuột nhắt và được sử dụng để sản xuất các tế bào lai.

2)-2 Sản xuất tế bào lai

Tế bào lá lách và tế bào u tủy của chuột nhắt P3X63Ag8U,1 (ATCC) được dung hợp tế bào sử dụng PEG 4000 (được sản xuất bởi IBL Co., Ltd.), nhờ đó tạo ra các tế bào lai.

Kết quả là, 9639 dòng từ chuột được gây miễn dịch bằng các tế bào LNCaP, 4043 dòng từ chuột được gây miễn dịch bằng các tế bào MCF7, và 3617 dòng từ chuột được gây miễn dịch bằng các tế bào AsPC1 được dùng làm tế bào lai. Bằng cách sử dụng dịch nổi nuôi cấy thu được của mỗi khối tế bào lai, tế bào lai sinh kháng thể được sàng lọc bằng thử nghiệm CDC.

2)-3 Sàng lọc kháng thể bằng thử nghiệm CDC

Vào ngày thứ 0, các tế bào LNCaP hoặc các tế bào MCF7 được pha loãng đến 5000 tế bào trong mỗi 80 μ l và dung dịch thu được được bổ sung vào đĩa 96 lỗ với lượng 80 μ l/lỗ. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy qua đêm. Dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào lai được bổ sung với lượng 20 μ l/lỗ vào đĩa mà trong đó các tế bào được tạo hạt, và đĩa này được để yên ở 4°C trong 1 giờ. Đối với bộ thể ở thử được pha loãng và được làm đông khô (Cedarlane Laboratories), 1 ml nước thanh trùng được bổ sung vào mỗi lọ nhỏ trên đá, và lọ nhỏ này được để yên trong 1 phút, sau đó bằng cách trộn, và sau đó hỗn hợp thu được được trộn với 19 ml môi trường 0,1% BSA/RPMI 1640 (BSA, Sigma Co., Ltd.). Phản ứng được cho phép diễn ra ở 37°C trong 1 giờ.

Đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để quay trở lại nhiệt độ phòng. 120 μ l chất phản ứng CellTiter-Glo (Promega Corporation) được bổ

sung vào mỗi lỗ, và phản ứng được cho phép diễn ra ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Lượng phát huỳnh quang được đo sử dụng thiết bị đọc đĩa (ARVO HTS, PerkinElmer, Inc.). Trong lỗ thể hiện sự phát quang thấp, đã xác định được rằng sự chết của tế bào phụ thuộc bổ thể được gây cảm ứng. Tế bào lai mà tạo ra dịch nổi tế bào nuôi cấy mà gây ra sự chết của tế bào phụ thuộc bổ thể được lựa chọn.

Kết quả là, 24 dòng từ các dòng có nguồn gốc từ quá trình gây miễn dịch bằng LNCaP, 36 dòng từ các dòng có nguồn gốc từ quá trình gây miễn dịch bằng MCF7, và 3 dòng từ các dòng có nguồn gốc từ quá trình gây miễn dịch bằng AsPC1 thu được dưới dạng các dòng dương tính bằng cách sàng lọc.

Ví dụ 3. Xác định kháng nguyên

3)-1 Xác định kết tủa miễn dịch

3)-1-1 Kết tủa miễn dịch

Các tế bào MCF7 được nuôi cấy ở nồng độ 5 đến 10×10^8 . Các tế bào này được tách bằng dụng cụ tách tế bào và tế bào tách được thu gom và được bảo quản ở nhiệt độ thấp ở -80°C . Đối với các tế bào được bảo quản ở nhiệt độ thấp này, 10 ml dung dịch đệm phân giải mà chứa 1% NP-40 (Sigma-Aldrich Co., Ltd.) và chất ức chế proteaza (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) và được làm mát xuống 4°C được bổ sung và hạt tế bào được phân giải trên đá bằng ống pipet theo cách sao cho tránh được sự tạo thành bọt khí. Sau khi được phân giải hoàn toàn, hạt tế bào được để yên trên đá trong 30 phút. Mẫu được hòa tan được ly tâm ở 4°C trong 20 phút ở 10000 đến 15000 vòng/phút, và dịch nổi thu được được chuyển đến ống Falcon 15 ml.

500 μl hạt protein G-Sepharose 4FF (Amersham Pharmacia Biotech Co., Ltd.) được rửa ba lần, và được thay đổi dung dịch đệm bằng dung dịch đệm phân giải. 500 μl hạt protein G-Sepharose 4FF được bổ sung vào dịch nổi mẫu hòa tan trên đá, và hỗn hợp thu được được khuấy quay qua đêm ở 4°C .

Mẫu này được đi qua cột sắc ký Poly-Prep (Bio-Rad Laboratories, Inc.), và phân đoạn đi qua được dùng làm mẫu kết tủa miễn dịch.

3 μg dung dịch kháng thể được sử dụng để kết tủa miễn dịch được bổ sung vào 50 μl hạt protein G-Sepharose 4FF được thay đổi dung dịch đệm bằng nước muối đệm bằng phosphat (PBS) (ống 1,5 ml), và hỗn hợp thu được được khuấy

quay ở 4°C trong 1 đến 16 giờ, nhờ đó kháng thể được liên kết với các hạt này. Đối với mẫu kết tủa miễn dịch, các hạt mà kháng thể liên kết với được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy quay ở 4°C trong 3 giờ.

Cột được chuyển đến ống Falcon rộng dung tích 15 ml, và 6,5 ml dung dịch đệm phân giải được bổ sung vào đó. Phương pháp này được lặp lại 4 lần.

Đầu ra của cột được bịt, và việc nhỏ giọt được tiến hành bằng 500 µl dung dịch đệm phân giải, và các hạt được thu gom trong ống 1,5 ml. Phương pháp này được lặp lại hai lần.

Sau khi ly tâm ở 4°C trong 1 phút ở 5000 vòng/phút, dịch nổi được tách loại một cách cẩn thận. Sau đó, 90 µl dung dịch đệm rửa giải (10 mM glyxin-HCl, pH 2,0) được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách làm chảy xoáy và ly tâm. Cột quay 1,5 ml được tách, và 10 µl dung dịch 1 M Tris-HCl (pH 8,5) được bổ sung vào đó, và cột được đưa trở lại vị trí ban đầu. Phân đoạn rửa giải được chuyển vào đó, và việc ly tâm được tiến hành ở 10000 vòng/phút trong 1 phút, nhờ đó thu được 100 µl mẫu.

Mẫu thu được được phân tích MS bằng kỹ thuật tách pha lỏng như được chỉ ra trong 3)-1-2 sau.

3)-1-2 Xác định kháng nguyên bằng phép phân tích phổ khối lượng

Bằng các phương pháp thông thường, phân đoạn thu được bằng phương pháp kết tủa miễn dịch được trải qua phản ứng tách ở 37°C trong 16 giờ bằng cách bổ sung trypsin (trypsin được biến đổi, Promega Corporation) thông qua kỹ thuật tách pha lỏng. Các peptit tách được được sắc ký lỏng (LC)/phổ khối nối tiếp (MS/MS) (Thermo Fisher Scientific K.K.). Dữ liệu phổ khối thu được được phân tích sử dụng phần mềm tra cứu dữ liệu (Mascot, Matrix Science K.K.). Dùng làm dữ liệu này, International Protein Index (IPI) được sử dụng. Kết quả là, 34 loại kháng nguyên được xác định.

Từ các đặc trưng của kháng nguyên được xác định, việc truy vấn thông tin thư mục được tiến hành dựa trên B7-H3 mà là protein màng tế bào, và bằng cách điều tiêu kháng nguyên B7-H3 (CD276) (biến thể 1 của B7-H3), các thực nghiệm được mô tả trong 3)-2 và 3)-3 sau được tiến hành.

3)-2 Chuẩn bị các tế bào biểu hiện gen kháng nguyên

Các tế bào NIH-3T3 (ATCC) được tạo hạt ở 5×10^4 tế bào/cm² trong bình

cầu được phủ collagen loại I (được sản xuất bởi IWAKI Co., Ltd.) và được nuôi cấy qua đêm trong môi trường DMEM (Invitrogen Corporation) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS) dưới các điều kiện 37°C và 5% CO₂.

Vào ngày tiếp theo, các tế bào NIH-3T3 được truyền nhiễm bằng mỗi pcDNA3.1-B7-H3 được tạo ra trong ví dụ 1)-1-1, biến thể 2 của pcDNA-DEST40-B7-H3 được tạo ra trong 1)-1-2, và pcDNA-DEST40 mà là vector rỗng sử dụng Lipofectamin 2000 (Invitrogen Corporation), và tiếp tục được nuôi cấy qua đêm dưới các điều kiện 37°C và 5% CO₂.

Vào ngày tiếp theo, các tế bào NIH-3T3 được truyền nhiễm được xử lý bằng trypsin, và được rửa bằng DMEM chứa 10% FBS, và sau đó được tạo huyền phù trong PBS chứa 5% FBS. Do đó huyền phù thu được được sử dụng trong phép phân tích đo dòng tế bào.

3)-3 Phân tích đo dòng tế bào

Tính đặc hiệu liên kết, đối với B7-H3, của kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai mà biến thể 1 kết tủa miễn dịch của B7-H3 được xác định bởi MS được khẳng định bằng phương pháp đo dòng tế bào. Huyền phù tế bào được điều chế trong 3)-2 được ly tâm, và dịch nổi được tách loại. Sau đó, dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào lai được bổ sung vào các tế bào NIH-3T3 được truyền nhiễm bằng mỗi vector để tạo huyền phù các tế bào, và các tế bào được để yên ở 4°C trong 1 giờ.

Sau khi các tế bào được rửa hai lần bằng PBS chứa 5% FBS, phân đoạn IgG dê được liên hợp floxextein với IgG chuột nhắt (phân tử của nó) (được sản xuất bởi ICN Pharmaceuticals, Inc., #55493) được pha loãng tới 1000 lần bằng PBS chứa 5% FBS được bổ sung vào đó để tạo huyền phù các tế bào, và các tế bào được để yên ở 4°C trong 1 giờ.

Sau khi các tế bào được rửa hai lần bằng PBS chứa 5% FBS, các tế bào được tái tạo huyền phù trong PBS chứa 5% FBS được bổ sung 2 µg/ml 7-aminoactinomycin D (được sản xuất bởi Invitrogen Corporation (các đoạn dò phân tử)), và việc phát hiện được tiến hành sử dụng tế bào kế dòng (FC500, Beckman Coulter, Inc.). Dữ liệu được phân tích sử dụng Flowjo (Tree Star, Inc.).

Các tế bào chết dương tính với 7-Aminoactinomycin D được bao gồm sử dụng cực. Sau đó, biểu đồ cường độ phát huỳnh quang FITC của các tế bào sống được được tạo ra.

Tế bào lai mà tạo ra mẫu mà có cường độ phát huỳnh quang trong biểu đồ cường độ phát huỳnh quang của các tế bào NIH-3T3 biểu hiện biến thể 1 của B7-H3 và các tế bào NIH-3T3 biểu hiện biến thể 2 của B7-H3 cao hơn trong biểu đồ cường độ phát huỳnh quang của các tế bào NIH-3T3 được truyền nhiễm bằng vector rỗng dùng làm đối chứng được lựa chọn dùng làm tế bào lai sản sinh kháng thể kháng B7-H3.

Kết quả là, đã khám phá ra rằng các kháng thể này có nguồn gốc từ các tế bào lai sản sinh kháng thể kháng B7-H3 của 5 dòng (L7, L8, L11, M30, và M31) có khả năng phản ứng chéo với biến thể 1 của B7-H3 và biến thể 2 của B7-H3.

3)-4 Khẳng định đặc tính liên kết của kháng thể đơn dòng với dòng tế bào ung thư

Đã được đánh giá liệu kháng thể đơn dòng được khẳng định liên kết với biến thể 1 của B7-H3 và biến thể 2 của B7-H3 trong ví dụ 3)-3 liên kết với các tế bào ung thư mà biểu hiện quá mức biến thể 1 của B7-H3 và biến thể 2 của B7-H3 bằng phương pháp đo dòng tế bào bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 3)-3.

Ở vị trí của các tế bào NIH-3T3 được truyền nhiễm, dòng tế bào ung thư vú ở người (MDA-MB-231) (ATCC) và dòng tế bào ung thư phổi ở người (NCI-H322) (ATCC) được sử dụng. Kết quả là, đã khẳng định được rằng kháng thể đơn dòng được tạo ra tất cả đều liên kết với các dòng tế bào ung thư.

3)-5 Xác định kiểu tương đương của kháng thể đơn dòng

Các kiểu tương đương của kháng thể đơn dòng được xác định sử dụng kit xác định kiểu tương đương đơn dòng ở chuột nhắt (được sản xuất bởi Serotec Co., Ltd.). Kết quả là, các kiểu tương đương của các kháng thể này có nguồn gốc từ các tế bào lai sản sinh kháng thể kháng B7-H3(L7, L8, L11, M30, và M31) tất cả được xác định là IgG2a.

3)-6 Chuẩn bị kháng thể đơn dòng

Kháng thể đơn dòng được tinh chế từ cổ trướng của chuột nhắt được cấy tế bào lai hoặc dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào lai (dưới đây, được gọi là “nguyên liệu khởi đầu để tinh chế kháng thể”).

Cổ trướng của chuột nhắt được chuẩn bị như sau. Đầu tiên, chuột nhắt BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japan, Inc.) 7 đến 8 tuần tuổi được xử lý bằng pristan (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.), và sau khoảng 3 tuần, tế bào lai được rửa bằng

nước muối sinh lý được cấy trong khoang bụng ở 1×10^7 tế vào trên chuột. Sau 1 đến 2 tuần, cổ trứng được tích tụ trong khoang bụng được thu gom và được thanh trùng qua dụng cụ lọc 0,22 μm , và vật liệu thu được được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để tinh chế kháng thể.

Dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào lai được điều chế sử dụng CELLline (được sản xuất bởi BD Biosciences, Inc.). Việc nuôi cấy được tiến hành theo phương pháp của nhà sản xuất ngoại trừ rằng môi trường sinh trưởng ClonaCell-HY E (được sản xuất bởi StemCell Technologies, Inc., #03805) được sử dụng làm môi trường này. Dịch nổi nuôi cấy thu gom được lọc qua dụng cụ lọc kích thước 0,45 μm , và vật liệu thu được được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để tinh chế kháng thể.

Kháng thể được tinh chế bằng cột ái lực thu được bằng cách làm bất hoạt protein tái tổ hợp A rPA50 (được sản xuất bởi RepliGen Corporation) trên Formyl-Cellulofine (được sản xuất bởi Seikagaku Corporation) (dưới đây được viết tắt là “Formyl-Cellulofine Protein A”) hoặc Hitrap MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Corporation). Trong trường hợp Formyl-Cellulofine Protein A, nguyên liệu khởi đầu để tinh chế kháng thể được pha loãng ba lần bằng dung dịch đệm liên kết (3 M NaCl, 1,5 M glyxin, pH 8,9), và dung dịch thu được được bổ sung vào cột, sau đó, cột này được rửa bằng dung dịch đệm liên kết này, sau đó pha loãng bằng 0,1 M axit xitric (pH 4,0). Mặt khác, trong trường hợp Hitrap MabSelect SuRe (GE Healthcare Corporation), nguyên liệu khởi đầu để tinh chế kháng thể được bổ sung vào cột, và cột này được rửa bằng PBS, sau đó pha loãng bằng 2 M Arginin-HCl (pH 4,0).

Sau khi dung dịch kháng thể được pha loãng được trung hòa, dung dịch đệm được thay đổi bằng PBS.

Nồng độ của kháng thể thu được bằng cách pha loãng kháng thể liên kết với POROS G 20 μm Column PEEK, 4,6 mm $\times$ 100 mm, 1,7 ml (Applied Biosystems, Inc.) và đo độ hấp thụ (O.D. 280 nm) của dịch rửa giải. Cụ thể, mẫu kháng thể được pha loãng bằng PBS được bổ sung vào POROS G 20 μm được làm cân bằng bằng dung dịch đệm làm cân bằng (30,6 mM natri dihydro phosphat/12 aq., 19,5 mM monokali phosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,0). Sau đó, cột này được rửa bằng dung dịch đệm làm cân bằng, và kháng thể liên kết với cột sau đó được pha loãng bằng dung dịch rửa giải (0,1% (v/v) HCl, 0,15 M NaCl). Diện tích của đỉnh hấp thụ (O.D. 280 nm) của dung dịch rửa giải được đo, và nồng độ được tính theo phương trình sau:

Nồng độ của mẫu kháng thể (mg/ml) = (Diện tích đỉnh của mẫu kháng thể) / (diện tích đỉnh của chuẩn tham chiếu (IgG1 người)) $\times$ Nồng độ chuẩn tham chiếu (mg/ml) $\times$ Hệ số pha loãng của mẫu.

Ngoài ra, nồng độ của endotoxin chứa trong kháng thể thu được được đo sử dụng Endospecy ES-50M Set (Seikagaku Corporation, #020150) và chuẩn tham chiếu endotoxin CSE-L Set (Seikagaku Corporation, #020055) và được khẳng định là 1 EU/mg hoặc thấp hơn. Kháng thể thu được được sử dụng trong thử nghiệm sau đó.

Ví dụ 4. Các tính chất của kháng thể kháng B7-H3

4)-1 Hoạt tính ADCP

1,5 ml thioglycolat được sử dụng trong khoang bụng của chuột nhắt Balb/c-nu/nu (chuột cái, ở 6 đến 10 tuần tuổi) (Charles River Laboratories Japan, Inc.). 5 ngày sau đó, các đại thực bào được thu gom từ khoang bụng. Các đại thực bào được bổ sung vào đĩa 24 lỗ ở 500 μ l/lỗ (1×10^5 tế bào/lỗ) và được nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Do đó các đại thực bào được chuẩn bị được sử dụng làm các tế bào cảm ứng.

Việc đánh dấu các tế bào NCI-H322 được dùng làm các tế bào đích được tiến hành sử dụng kit đánh dấu màu PKH26 (Sigma Co., Ltd.) Các tế bào đích được tách bằng TrypLE (Invitrogen Corporation) và được rửa hai lần bằng PBS. Các tế bào được tạo huyền phù trong dung dịch pha loãng C ở 1×10^7 tế bào/ml. Vật liệu nhuộm màu PKH26 (1 mM) được pha loãng tới 8 μ M bằng dung dịch pha loãng C, và ngay sau đó, dung dịch nhuộm màu loãng được bổ sung vào đó với lượng bằng với lượng huyền phù tế bào. Hỗn hợp thu được được đặt ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, 1 ml huyết thanh được bổ sung vào đó, và tiếp theo, môi trường chứa huyết thanh được bổ sung vào đó, và việc rửa được tiến hành hai lần. Do đó các tế bào được chuẩn bị được dùng làm các tế bào đích.

Kháng thể thu được trong ví dụ 3)-6 được pha loãng tới 20 μ g/ml bằng dung dịch nuôi cấy. Sau đó, các tế bào đích thu được trong ví dụ 4)-1-1 được phân tán ở 2×10^6 tế bào/100 μ l/ống và được trộn. Hỗn hợp thu được được để yên trên đá trong 30 phút. Dịch nổi được tách loại, và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch nuôi cấy và được tạo huyền phù trong 500 μ l dung dịch nuôi cấy. Dịch nổi được tách loại ra khỏi các tế bào cảm ứng, và các tế bào được xử lý với kháng thể và được tạo

huyền phù trong dung dịch nuôi cấy được bổ sung vào đó và được trộn trong đó. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong 3 giờ trong thiết bị ủ CO₂. Sau đó, các tế bào được tách bằng Trypsin-EDTA và được thu gom. Đối với các tế bào được thu gom này, kháng thể CD11b kháng chuột được đánh dấu bằng FITC (Becton, Dickinson và Company, Ltd.) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được để yên trên đá trong 30 phút. Dịch nổi được tách loại, và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch nuôi cấy. Các tế bào thu gom được tạo huyền phù trong 300 µl dung dịch nuôi cấy và được phân tích bằng FACS Calibur (Becton, Dickinson và Company, Ltd.). Trong các đại thực bào dương tính với CD11b, thành phần dương tính với PKH26 được đánh giá dùng làm các tế bào dương tính với thực bào (n=3).

Kết quả là, như được chỉ ra trong Fig.1, L7, L8, L11, M30, và M31 được gây cảm ứng thực bào của tế bào NCI-H322 bởi các đại thực bào để tạo ra phần trăm thực bào lần lượt bằng 48,0 ± 0,9%, 52,3 ± 1,1%, 57,1 ± 2,5%, 61,9 ± 2,1%, và 57,7 ± 3,0%. Theo đó, đã cho thấy rằng L7, L8, L11, M30, và M31 kháng thể có hoạt tính ADCP kháng tế bào NCI-H322.

Theo cách tương tự, kháng thể kháng B7-H3 có bán trên thị trường thu được và hoạt tính ADCP của nó được đo. Kháng thể chuột chống kháng B7-H3 ở người MIH35 (eBioscience Company), kháng thể chuột nhất kháng B7-H3 ở người 185504 (R&D Systems, Inc.), MIH42 (Serotec Co., Ltd.), và DCN70 (Biolegend Company) thu được. Đã khẳng định được rằng các kháng thể này liên kết với B7-H3 bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 3)-3. Bằng cách sử dụng các kháng thể này, hoạt tính ADCP được đo bằng phương pháp nêu trên.

Kết quả là, như được chỉ ra trong Fig.2, khi được bổ sung ở 1 µg/ml, MIH35, MIH42, và DCN70 gây cảm ứng thực bào của tế bào NCI-H322 bởi các đại thực bào để tạo ra phần trăm thực bào bằng 4,2%, 8,2%, và 10,8%. Theo đó, đã cho thấy rằng MIH35, MIH42, và DCN70 hầu như không thể hiện hoạt tính ADCP.

Từ các kết quả này, đã cho thấy rằng các dòng M30 nhận diện B7-H3 thu được bằng cách sàng lọc có hoạt tính ADCP cao hơn đáng kể so với kháng thể B7-H3 có bán trên thị trường.

4)-2 hoạt tính ADCC

4)-2-1 Chuẩn bị các tế bào cảm ứng

Lá lách được tách vô trùng ra khỏi chuột nhất được cạo lông

CAN.Cg-Foxn1^{nu}/CrlCrlj (Charles River Laboratories Japan, Inc.). Lá lách tách được này được đồng nhất với hai kính trượt, và được xử lý phân giải đồng nhất sử dụng thiết bị BD Pharm Lyse (được sản xuất bởi BD Biosciences, Ltd. #555899). Tế bào lá lách thu được được tạo huyền phù trong RPMI 1640 không chứa đỏ phenol (được sản xuất bởi Invitrogen Corporation) chứa 10% huyết thanh bào thai bò, Ultra-low IgG (được sản xuất bởi Invitrogen Corporation) (dưới đây được viết tắt dưới dạng “môi trường ADCC”), và huyền phù tế bào được cho đi qua bộ lọc tế bào (kích thước lỗ: 40 μ m, được sản xuất bởi BD Biosciences, Ltd.). Sau đó, các tế bào sống sót được đếm bằng thử nghiệm loại trừ màu chất nhuộm màu xanh trypan. Sau khi huyền phù tế bào lá lách được ly tâm, môi trường được tách loại, và các tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường ADCC ở mật độ tế bào sống sót bằng $1,5 \times 10^7$ tế bào/ml và được dùng làm các tế bào cảm ứng.

4)-2-2 Chuẩn bị các tế bào đích

Các tế bào 293 biểu hiện B7-H3 (ATCC) và tế bào 293 được gây nhiễm bằng vectơ rỗng được chuẩn bị bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 3)-3 được xử lý bằng trypsin, và các tế bào được xử lý của mỗi loại được rửa bằng RPMI 1640 chứa 10% FBS (Invitrogen Corporation) và sau đó được tái tạo huyền phù trong RPMI 1640 chứa 10% FBS. Các tế bào (4×10^6 tế bào) của mỗi loại được trộn với crom-51 (5550 kBq) được thanh lọc qua thiết bị lọc 0,22 μ m, và việc đánh dấu được tiến hành trong 1 giờ dưới các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Các tế bào được đánh dấu được rửa ba lần bằng RPMI 1640 chứa 10% FBS (Invitrogen Corporation), và các tế bào được tái tạo huyền phù ở 2×10^5 tế bào/ml trong môi trường ADCC và được dùng làm các tế bào đích.

4)-2-3 Thử nghiệm giải phóng ⁵¹Cr

Các tế bào đích ở mật độ tế bào bằng 2×10^5 tế bào/ml được phân tán ở 50 μ l/lỗ trong vi đĩa đáy hình chữ U có 96 lỗ. 50 μ l M30 hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương (mIgG2a) (eBioscience Company) được bổ sung vào đó, được pha loãng bằng môi trường ADCC sao cho nồng độ cuối của kháng thể sau khi bổ sung tế bào cảm ứng là 2,5 μ g/ml. Sau đó, đĩa được để yên ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, 100 μ l tế bào cảm ứng ở mật độ tế bào bằng $1,5 \times 10^7$ tế bào/ml được bổ sung vào đó, và các tế bào được nuôi cấy qua đêm dưới các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, dịch nổi tế bào được thu gom trong LumaPlate (được sản xuất bởi PerkinElmer, Inc.), và phóng xạ gama phát ra từ đó được đo sử dụng bộ đếm gama. Phần trăm phân giải tế bào gây ra do hoạt tính ADCC được tính theo phương trình

sau.

$$\text{Phần trăm phân giải tế bào (\%)} = (A-B) / (C-B) \times 100$$

A: Số đếm phóng xạ từ lỗ chứa mẫu

B: Số đếm sự phát xạ tức thời trung bình (từ các lỗ mà kháng thể và tế bào cảm ứng không được bổ sung) (n=3). Phương pháp tương tự như đối với lỗ mẫu này được tiến hành ngoại trừ môi trường ADCC được bổ sung lượng 50 μ l ở thời điểm bổ sung kháng thể và với lượng bằng 100 μ l ở thời điểm bổ sung tế bào cảm ứng.

C: Số đếm sự phát xạ cực đại trung bình (từ các lỗ mà trong đó các tế bào đích được hòa tan với chất hoạt động bề mặt) (n=3). Phương pháp tương tự đối với lỗ mẫu này được tiến hành ngoại trừ 50 μ l môi trường ADCC được bổ sung ở thời điểm bổ sung kháng thể và 100 μ l môi trường ADCC chứa 2% (v/v) Triton X-100 được bổ sung ở thời điểm bổ sung tế bào cảm ứng.

Dữ liệu được thể hiện là giá trị trung bình của các phép đo ba lần, và các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn. Giá trị P được tính sử dụng thử nghiệm t của Student. Các kết quả đo được thể hiện trong Fig.3.

Kết quả là, M30 đã thể hiện hoạt tính phân giải tế bào với phần trăm phân giải tế bào bằng $31,6 \pm 3,3\%$ kháng các tế bào 293 biểu hiện B7-H3, và do đó, đã cho thấy rằng kháng thể M30 có hoạt tính ADCC kháng các tế bào 293 biểu hiện B7-H3.

4)-3 Hoạt tính CDC

Thử nghiệm được tiến hành bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 2)-3. Dùng làm các tế bào để sử dụng trong phép đánh giá này, tế bào NCI-H322 được sử dụng. Mỗi kháng thể kháng B7-H3 (L7, L8, L11, M30, và M31) thu được trong ví dụ 3)-6 và kháng thể đối chứng kiểu tương đương (mIgG2a) được pha loãng bằng RPMI 1640 chứa 10% FBS (chứa chất kháng sinh: penixilinpenixilin và streptomycin) được bổ sung sao cho nồng độ cuối của kháng thể sau khi bổ sung bổ thể là 25 μ g/ml, và hỗn hợp thu được được để yên ở 4°C trong 1 giờ. Ngoài ra, bổ thể thỏ (được sản xuất bởi Cedarlane Laboratories, #CL3051) được pha loãng tới 30% bằng RPMI 1640 sao cho nồng độ cuối của bổ thể là 5%, và hỗn hợp thu được được ủ trong 1 giờ dưới các điều kiện 37°C và 5% CO₂. Sau đó, hỗn hợp được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Để đo khả năng sống sót của tế bào,

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (được sản xuất bởi Promega Corporation) được bổ sung vào đó với lượng bằng với lượng dung dịch nuôi cấy, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, lượng phát huỳnh quang được đo sử dụng thiết bị đọc đĩa. Khả năng sống sót của tế bào được tính theo phương trình sau.

$$\text{Khả năng sống sót của tế bào (\%)} = (a-b) / (c-b) \times 100$$

a: Lượng phát quang từ lỗ chứa mẫu

b: lượng phát huỳnh quang trung bình của nền (từ các lỗ mà các tế bào và kháng thể không được bổ sung) (n=3). Phương pháp tương tự đối với lỗ mẫu này được tiến hành ngoại trừ rằng lượng tương đương của RPMI 1640 chứa 10% FBS (chứa các kháng sinh: penixilin và streptomycin) được bổ sung thay vì huyền phù tế bào ở thời điểm tạo hạt tế bào và RPMI 1640 chứa 10% FBS (chứa chất kháng sinh: penixilin và streptomycin) được bổ sung lượng bằng với lượng của dung dịch pha loãng kháng thể ở thời điểm bổ sung kháng thể.

c: Lượng phát quang trung bình từ các lỗ mà kháng thể không được bổ sung (n=3). Phương pháp tương tự đối với lỗ mẫu này được tiến hành ngoại trừ rằng RPMI 1640 chứa 10% FBS (chứa chất kháng sinh: penixilin và streptomycin) được bổ sung lượng bằng với lượng của dung dịch pha loãng kháng thể ở thời điểm bổ sung kháng thể.

Các kết quả đo được thể hiện trong Fig.4. Dữ liệu được thể hiện là giá trị trung bình của các phép đo ba lần, và các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn. Kết quả là, kháng thể đối chứng, L7, L8, L11, M30, và M31 gây ra sự suy giảm về khả năng sống sót của tế bào của các tế bào NCI-H322 đến $101,5 \pm 3,3\%$, $6,3 \pm 4,2\%$, $13,6 \pm 9,1\%$, $7,2 \pm 1,4\%$, $7,5 \pm 1,8\%$, và $12,8 \pm 2,0\%$, với sự có mặt của bề mặt. Do đó, đã cho thấy rằng kháng thể L7, L8, L11, M30, và M31 có hoạt tính CDC kháng các tế bào NCI-H322.

4)-4 Xác định vùng liên kết

Đã xác định được vùng của B7-H3 mà M30 liên kết bằng phương pháp đo dòng tế bào bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 3)-3. Các tế bào NIH-3T3 được gây nhiễm bằng mỗi vector biểu hiện đối với các protein riêng phần của B7-H3 được chuẩn bị trong ví dụ 1)-1-3 được sử dụng.

Kết quả là, như được chỉ ra trong Fig.5, đã khẳng định được rằng M30 liên kết với B7-H3 IgC1, B7-H3 IgC2, B7-H3 IgC1-V2-C2, và B7-H3 IgV2-C2. M30 đã không liên kết với B7-H3 IgV1 và B7-H3 IgV2.

Từ các kết quả này, đã cho thấy rằng M30 liên kết với vùng C1 (trình tự axit amin có số axit amin từ 140 đến 244 trong SEQ ID NO: 6) và vùng C2 (trình tự axit amin có số axit amin từ 358 đến 456 trong SEQ ID NO: 6) của B7-H3. Theo phương pháp tương tự, cũng đã cho thấy rằng L8, L11, và M31 liên kết với vùng C1 và vùng C2, và L7 liên kết với vùng V1 (trình tự axit amin có số axit amin từ 27 đến 139 trong SEQ ID NO: 6) và vùng V2 (trình tự axit amin có số axit amin từ 245 đến 357 trong SEQ ID NO: 6).

Theo đó, đã cho thấy rằng M30 nhận diện epitop trong vùng IgC1 và/hoặc vùng IgC2, mỗi vùng mà là vùng trong vùng ngoại bào B7-H3, và liên kết với vùng IgC1 hoặc vùng IgC2 hoặc cả hai.

4)-5 Tính đặc hiệu kháng nguyên

Tính đặc hiệu kháng nguyên của M30 được đánh giá bằng phương pháp đo dòng tế bào bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 3)-3.

Các tế bào 293T được gây nhiễm bằng mỗi vector biểu hiện đối với các protein CD80, CD86, B7-RP-1, B7-H1, B7-DC, và B7-H4, mà là các họ protein B7, được tạo ra trong ví dụ 1)-1-4 được sử dụng.

Kết quả là, đã cho thấy rằng M30 không liên kết với CD80, CD86, B7-RP-1, B7-H1, B7-DC, và B7-H4, mà là các phân tử họ B7.

Ví dụ 5. Tác dụng chống ung thư *in vivo*

5)-1 Tác dụng chống ung thư *in vivo* của kháng thể kháng B7-H3

Các tế bào NCI-H322 được tách ra khỏi bình cầu nuôi cấy bằng phương pháp xử lý bằng trypsin, và sau đó được tạo huyền phù trong RPMI 1640 chứa 10% FBS (Invitrogen Corporation), sau đó bằng cách ly tâm, và dịch nổi được tách loại. Các tế bào được rửa hai lần bằng môi trường tương tự, và sau đó được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý (được sản xuất bởi Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.). Sau đó, các tế bào được cấy dưới da trong vùng nách của mỗi nhóm chuột nhắt BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japan, Inc.) 6 tuần tuổi ở liều dùng bằng 1×10^7 tế bào/chuột nhắt. Ngày cấy được tính từ ngày 0, và vào ngày 10, 17, 24, 31, và 38, mỗi

kháng thể L7, L8, L11, M30, và M31 được sử dụng trong bụng ở liều dùng bằng 500 μ g/chuột nhất (khoảng 25 mg/kg). Đối với mẫu đối chứng, PBS được sử dụng trong bụng với thể tích (500 μ l) bằng thể tích của kháng thể. Thể tích khối u được đo vào ngày 10, 17, 24, 31, 38, và 45, và hiệu quả chống khối u của kháng thể đã được đánh giá.

Kết quả là, trong các nhóm sử dụng M30 và M31, sự phát triển của khối u được hạn chế một cách đáng kể khi so sánh với nhóm sử dụng PBS. (Các giá trị P đối với M30 và M31 được so sánh với nhóm sử dụng PBS về thể tích khối u vào ngày thứ 45 lần lượt là $P < 0,05$ và $P < 0,01$. Các giá trị P được tính sử dụng thử nghiệm t của Student.). Ngoài ra, tỷ lệ ức chế sự tăng trưởng của khối u ($= 100 - (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm sử dụng kháng thể}) / (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm sử dụng PBS}) \times 100$) vào ngày thứ 45 trong trường hợp của L7, L8, L11, M30, và M31 lần lượt là -16,1%, 0,2%, 25,5%, 47,2%, và 58,2%. Theo đó, kháng thể M30 và M31 đã cho thấy có hiệu quả chống khối u rất mạnh *in vivo* (Fig.6).

Từ các kết quả nêu trên, đã cho thấy rằng kháng thể M30 và M31 là kháng thể mà nhận diện kháng nguyên B7-H3 và thể hiện tác dụng chống khối u.

5)-2 Tác dụng chống khối u *in vivo* dưới các điều kiện làm suy yếu các đại thực bào

Để làm suy yếu các đại thực bào *in vivo*, các liposom được bao nang bằng clodronat được tạo ra. Đã được báo cáo rằng bằng cách sử dụng các liposom được bao nang bằng clodronat *in vivo*, các đại thực bào *in vivo* được làm suy yếu (Journal of immunological methods 1994, vol. 174, pp. 83-93). Theo phương pháp trong báo cáo này, các liposom được bao nang bằng clodronat được tạo ra và được sử dụng trong thực nghiệm sau.

Các tế bào NCI-H322 được tách ra khỏi bình cầu nuôi cấy bằng cách xử lý bằng trypsin, và sau đó được tạo huyền phù trong RPMI 1640 chứa 10% FBS (Invitrogen Corporation), sau đó bằng cách ly tâm và dịch nổi được tách loại. Các tế bào được rửa hai lần bằng môi trường tương tự, và sau đó được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý (PBS, được sản xuất bởi Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.). Sau đó, các tế bào được cấy dưới da trong vùng nách của mỗi con chuột nhất BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA Japan, Inc.) ở 6 tuần tuổi với liều dùng bằng 1×10^7 tế bào/chuột nhất. Ngày cấy được tính từ ngày 14, và việc lập nhóm được tiến hành trên ngày thứ 0.

Trong nhóm mà trong đó các đại thực bào *in vivo* trong chuột nhắt bị làm suy yếu, các liposom được bao nang bằng clodronat được tiêm vào tĩnh mạch ở liều dùng bằng 0,2 ml/chuột nhắt vào ngày 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, và 32. Ngoài ra, trong nhóm đối chứng âm, PBS được tiêm vào tĩnh mạch ở liều dùng bằng 0,2 ml/chuột nhắt vào cùng ngày (vào ngày 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, và 32).

Sau đó, kháng thể M30 được sử dụng trong bụng cho cả hai nhóm ở liều dùng bằng 500 µg/chuột nhắt (khoảng 25 mg/kg) vào ngày 1, 8, 15, 22, và 29. Ngoài ra, dùng làm đối chứng âm, PBS được sử dụng trong bụng cho cả hai nhóm với thể tích (500 µl) bằng với nhóm kháng thể M30 vào cùng ngày (vào ngày 1, 8, 15, 22, và 29).

Thể tích khối u được đo vào ngày 0, 8, 15, 22, 29, và 36, và hiệu quả chống khối u của việc sử dụng kháng thể được đánh giá (n=8).

Các kết quả được thể hiện trong các bảng 1 và 2, và Fig.7.

Bảng 1

Thể tích khối u	Vào ngày thứ 0		Vào ngày thứ 8		Vào ngày thứ 15	
	Trung bình (mm ³)	Độ lệch chuẩn	Trung bình (mm ³)	Độ lệch chuẩn	Trung bình (mm ³)	Độ lệch chuẩn
Nhóm sử dụng PBS + PBS	104,375	6,491581086	149	10,60828517	227,5	18,20027472
Nhóm sử dụng Clod lip + PBS	114,625	4,862162585	159,375	7,676349346	318,625	26,37567704
Nhóm sử dụng PBS + M30	103,5	7,221001118	123,625	14,89958952	145	19,58497967
Nhóm sử dụng Clod lip + M30	104,625	5,47049717	143,375	10,46753058	247,75	24,44947414

Thể tích khối u	Vào ngày thứ 22		Vào ngày thứ 29		Vào ngày thứ 36	
	Trung bình (mm ³)	Độ lệch chuẩn	Trung bình (mm ³)	Độ lệch chuẩn	Trung bình (mm ³)	Độ lệch chuẩn
Nhóm sử dụng PBS +PBS	394,75	25,77772433	601,25	43,17065389	827	50,82638516
Nhóm sử dụng Clod lip + PBS	443,625	23,52653327	619,75	40,9550058	1002,75	78,18493415
Nhóm sử dụng PBS + M30	186,25	25,920035	301,75	47,13610612	415,25	79,84175197
Nhóm sử dụng Clod lip + M30	384,25	40,10644319	641,375	80,12176838	837,25	121,349223

Trong nhóm sử dụng trong tĩnh mạch PBS + sử dụng trong màng bụng kháng thể M30 (nhóm sử dụng PBS + M30), sự tăng trưởng khối u được hạn chế một cách đáng kể khi được so sánh với nhóm sử dụng trong tĩnh mạch PBS + sử dụng trong màng bụng PBS (nhóm sử dụng PBS + PBS) dùng làm đối chứng âm. Để hiệu

quả hơn, giá trị P đối với nhóm sử dụng PBS + M30 được so sánh với nhóm sử dụng PBS + PBS về thể tích khối u vào ngày thứ 36 là $P < 0,05$ (giá trị P được tính sử dụng thử nghiệm t của Student.). Ngoài ra, tỷ lệ ức chế sự tăng trưởng của khối u ($= 100 - (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm sử dụng PBS + M30}) / (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm sử dụng PBS + PBS}) \times 100$) vào ngày thứ 36 là 49,8% (bảng 2).

Mặt khác, trong nhóm sử dụng trong tĩnh mạch liposom được bao nang bằng clodronat + sử dụng trong màng bụng PBS (nhóm sử dụng Clod lip + PBS) và nhóm sử dụng trong tĩnh mạch liposom được bao nang bằng clodronat + sử dụng trong màng bụng kháng thể M30 (nhóm sử dụng Clod lip + M30), sự ức chế tăng trưởng khối u không quan sát thấy. Để đặc hiệu hơn, các giá trị P đối với nhóm sử dụng Clod lip + PBS và nhóm sử dụng Clod lip + M30 được so sánh với nhóm sử dụng PBS + PBS về thể tích khối u vào ngày thứ 36 lần lượt là $P = 0,52$ và $P = 1$. (Các giá trị P được tính sử dụng thử nghiệm t của Student). Ngoài ra, tỷ lệ ức chế sự tăng trưởng của khối u ($= 100 - (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm sử dụng Clod lip + PBS hoặc nhóm sử dụng Clod lip + M30}) / (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm sử dụng PBS + PBS}) \times 100$) vào ngày thứ 36 lần lượt là -21,2% và -1,4%, (bảng 2).

Bảng 2

Tỷ lệ ức chế sự tăng trưởng khối u (%)	Vào ngày thứ 8	Vào ngày thứ 15	Vào ngày thứ 22	Vào ngày thứ 29	Vào ngày thứ 36
Nhóm sử dụng Clod lip + PBS	-6,6	-39,4	-12,6	-3,5	-21,2
Nhóm sử dụng PBS + M30	17,5	36,4	52,8	49,7	49,8
Nhóm sử dụng Clod lip + M30	3,2	-8,6	2,6	-6,6	-1,4

Từ các kết quả nêu trên, đã cho thấy rằng hiệu quả chống khối u của kháng thể M30 được ức chế bằng cách sử dụng các liposom được bao nang bằng clodronat, và do đó, đã cho thấy rằng hiệu quả chống khối u của kháng thể M30 là tác dụng

chính gây ra bởi các đại thực bào.

Ví dụ 6. Tách dòng kháng thể M30 cADN chuột nhắt và xác định trình tự

6)-1 Xác định các trình tự axit amin của đầu tận cùng N của các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể M30 chuột nhắt

Để xác định các trình tự axit amin của đầu tận cùng N của các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể chuột nhắt M30 này, kháng thể chuột nhắt M30 được tinh chế trong ví dụ 3)-6 được tách bởi SDS-PAGE. Protein trong gel được chuyển từ gel này sau khi tách màng PVDF (kích thước lỗ: 0,45 μ m, được sản xuất bởi Invitrogen Corporation). Màng được rửa bằng dung dịch đệm rửa (25 mM NaCl, 10 mM dung dịch đệm natri borat pH 8,0), và sau đó được nhuộm màu bằng cách nhúng trong dung dịch nhuộm màu (50% metanol, 20% axit axetic, 0,05% xanh sáng Coomassie) trong 5 phút, sau đó bằng cách làm mất màu bằng 90% metanol. Các phần của dải tương ứng với chuỗi nặng (dải với độ linh động nhỏ hơn) và dải tương ứng với chuỗi nhẹ (dải với độ linh động lớn hơn) được nhìn thấy trên màng PVDF được tách ra.

Phần của dải tương ứng với chuỗi nhẹ được ủ ở 37°C trong 30 phút với lượng nhỏ của polyvinylpyrrolidon 0,5% / dung dịch axit axetic 100 mM, sau đó rửa lỗ này với nước. Sau đó, gốc đầu tận cùng N được biến đổi được tách loại sử dụng Kit Pyroglutamat Aminopeptidaza Pfu (TaKaRa Bio, Inc.), sau đó rửa với nước và làm khô trong không khí. Sau đó, xác định các trình tự axit amin đầu tận cùng N tương ứng bằng phương pháp tự động của Edman (xem: Edman et al. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80) sử dụng Procise (nhãn hiệu đã được đăng ký) cLC Protein Sequencer Model 492cLC (Applied Biosystems, Inc.).

Kết quả là, trình tự axit amin đầu tận cùng N của dải tương ứng với chuỗi nặng của kháng thể chuột nhắt M30 được xác định là EVQLQQSGPE (SEQ ID NO: 44 trong danh mục trình tự), và trình tự axit amin đầu tận cùng N của dải tương ứng với chuỗi nhẹ của nó được xác định là IVLSQSPTILSASP (SEQ ID NO: 45 trong danh mục trình tự).

6)-2 Điều chế mARN từ tế bào lai sản sinh kháng thể M30 chuột nhắt

Để tách dòng các cADN mã hóa mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể chuột nhắt M30 này, mARN được điều chế từ tế bào lai sản sinh kháng thể chuột nhắt M30 sử dụng kit tinh chế điều chế nhanh mARN (GE Healthcare Corporation).

6)-3 Tách dòng cADN của kháng thể M30 chuột nhắt và xác định trình tự

Với việc đề cập đến các phát hiện mà các kiểu tương đương của các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể chuột nhắt M30 là $\gamma 2a$ và κ tìm thấy trong ví dụ 3)-5, và các trình tự axit amin của đầu tận cùng N của các chuỗi nặng và nhẹ được xác định trong ví dụ 1-1), và dữ liệu về các trình tự axit amin của kháng thể (xem: Kabat, E. A. et al., (1991) in Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. I và II, U.S. Department of Health và Human Services), một vài đoạn mỗi oligonucleotit lai với mỗi vùng đầu tận cùng 5' của vùng mã hóa gen kháng thể và vùng đầu 3' của nó bao gồm codon kết thúc được tổng hợp, và cADN mã hóa chuỗi nặng và cADN mã hóa chuỗi nhẹ được khuếch đại sử dụng mARN điều chế được trong ví dụ 6-2) và TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (TaKaRa Bio, Inc.). Kết quả là, cADN mã hóa chuỗi nặng của kháng thể và cADN mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được khuếch đại bằng các bộ đoạn mỗi sau.

Bộ đoạn mỗi cho chuỗi nặng

Đoạn mỗi 16

5'-aagaattcatggaatggagtggata-3' (SEQ ID NO: 46 trong danh mục trình tự)

Đoạn mỗi 17

5'-aagatatctcatttaccggagtcgggagaa-3' (SEQ ID NO: 47 trong danh mục trình tự)

Bộ đoạn mỗi cho chuỗi nhẹ

Đoạn mỗi 18

5'-aagaattcatggattttctggtgcag-3' (SEQ ID NO: 48 trong danh mục trình tự)

Đoạn mỗi 19

5'-aagatatcttaacactcattctgtgaagct-3' (SEQ ID NO: 49 trong danh mục trình tự)

Mỗi cADN mã hóa chuỗi nặng và cADN mã hóa chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng PCR được tách dòng sử dụng kit làm biểu hiện pEF6/V5-His TOPO TA (Invitrogen Corporation), và mỗi trình tự nucleotit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tách dòng được xác định sử dụng thiết bị phân tích trình tự gen ("ABI PRISM 3700 ADN Analyzer; Applied Biosystems" hoặc "Applied Biosystems 3730xl Analyzer; Applied Biosystems"). Trong phản ứng xác định trình tự, GeneAmp 9700 (Applied

Biosystems, Inc.) được sử dụng.

Trình tự nucleotit xác định được của cADN mã hóa chuỗi nặng của kháng thể chuột nhất M30 được nêu trong SEQ ID NO: 50 trong danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 51. Ngoài ra, các trình tự của các SEQ ID NO: 50 và 51 được thể hiện trong Fig.21.

Trình tự nucleotit xác định được của cADN mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể chuột nhất M30 được nêu trong SEQ ID NO: 52 trong danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 53 trong danh mục trình tự. Các trình tự của các SEQ ID NO: 52 và 53 được thể hiện trong Fig.22.

Ngoài ra, các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được phân tích bằng cách so sánh sử dụng KabatMan (xem: PROTEINS: Structure, Function và Genetics, 25 (1996), 130-133), mà là dữ liệu về các trình tự axit amin của kháng thể. Kết quả là, đã khám phá ra rằng trong chuỗi nặng của kháng thể chuột nhất M30 này, trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 51 trong danh mục trình tự là vùng biến đổi. Cũng đã khám phá ra rằng trong chuỗi nhẹ của kháng thể chuột nhất M30 này, trình tự axit amin có số axit amin từ 23 đến 130 trong SEQ ID NO: 53 trong danh mục trình tự là vùng biến đổi.

Ví dụ 7. Sản xuất kháng thể khảm M30 (kháng thể cM30)

7)-1 Cấu trúc của thể khảm và vectơ biểu hiện chuỗi nhẹ được làm giống người pEF6KCL

Bằng cách tiến hành PCR sử dụng plasmit pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) dùng làm khuôn và cũng sử dụng các đoạn môi sau, đoạn ADN từ ngay phía sau BGHpA (vị trí trình tự: 2174) tới SmaI (vị trí trình tự: 2958) (đoạn ADN bao gồm gốc sao chép f1 và đoạn khởi đầu SV40 và gốc, dưới đây được gọi là “đoạn A”) thu được.

Đoạn môi 20

5'-ccacgcgcctgtagcggcgccattaagc-3' (SEQ ID NO: 54 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 21

5'-aaacccgggagcttttgcaaaagcctagg-3' (SEQ ID NO: 55 trong danh mục trình tự)

Đoạn A thu được và đoạn ADN (SEQ ID NO: 56, dưới đây được gọi là “đoạn B”, trình tự SEQ ID NO: 56 cũng được thể hiện trong Fig.23) bao gồm trình tự ADN mã hóa tín hiệu gây tiết của chuỗi κ ở người, vùng hằng định của chuỗi κ của người, và tín hiệu bổ sung poly-A ở người được gắn với nhau bởi PCR kéo dài chồng lặp. Do đó đoạn ADN thu được mà trong đó đoạn A và đoạn B được gắn với nhau được phân giải bằng các enzym giới hạn KpnI và SmaI, mà được gắn với plasmit pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) mà được phân giải bằng các enzym giới hạn KpnI và SmaI, nhờ đó thể khảm và vector biểu hiện chuỗi nhẹ được làm giống người pEF6KCL có trình tự tín hiệu này, vị trí tách dòng, vùng hằng định chuỗi κ ở người, và trình tự tín hiệu bổ sung poly-A ở người phía sau đoạn khởi đầu EF1 được cấu trúc.

7)-2 Cấu trúc pEF1KCL

Đoạn ADN thu được bằng cách tách pEF6KCL thu được bằng phương pháp được mô tả trên đây bằng các enzym giới hạn KpnI và SmaI được gắn với pEF1/myc-HisB (Invitrogen Corporation) mà được phân giải bằng KpnI và SmaI, nhờ đó plasmit pEF1KCL này được cấu trúc.

7)-3 Cấu trúc của thể khảm và vector biểu hiện chuỗi nặng được làm giống người pEF1FCCU

Đoạn ADN (SEQ ID NO: 57, trình tự SEQ ID NO: 57 cũng được thể hiện trong Fig.24) bao gồm trình tự ADN mã hóa axit amin của trình tự tín hiệu và vùng hằng định của IgG1 ở người được phân giải bằng các enzym giới hạn NheI và PmeI và được gắn với plasmit pEF1KCL mà được phân giải bằng NheI và PmeI, nhờ đó thể khảm và vector biểu hiện chuỗi nặng giống người pEF1FCCU có trình tự tín hiệu, vị trí tách dòng, vùng hằng định của chuỗi nặng ở người, và trình tự tín hiệu bổ sung poly-A ở người phía sau đoạn khởi đầu EF1 được cấu trúc.

7)-4 Cấu trúc của vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu thể khảm M30

Bằng cách sử dụng cADN mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể chuột nhất M30 này dùng làm khuôn và cũng sử dụng KOD-Plus- (TOYOBO, Co., Ltd.) và bộ đoạn mới sau, vùng bao gồm cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại. Đoạn ADN thu được bằng cách tách sản phẩm được khuếch đại bằng các enzym giới hạn NdeI và BsiWI được chèn vào trong vector biểu hiện chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống người và thể khảm nói chung (pEF6KCL) ở vị trí tách được bằng

các enzym giới hạn NdeI và BsiWI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nhẹ kiểu thể khảm M30 được cấu trúc. Vector biểu hiện thu được được đặt tên là “pEF6KCL/M30L”. Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kiểu thể khảm M30 được nêu trong SEQ ID NO: 58 trong danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 59. Các trình tự của các SEQ ID NO: 58 và 59 được thể hiện trong Fig.25. Ngoài ra, gốc threonin ở vị trí 128 trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự ở đầu carboxyl của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và tương ứng với gốc alanin ở vị trí 130 trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể M30 được nêu trong SEQ ID NO: 53 trong danh mục trình tự, tuy nhiên, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59, gốc này đã được thể bằng gốc threonin có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ kháng thể ở người.

Bộ đoạn môi cho chuỗi nhẹ

Đoạn môi 22

5'-aaacatatggccaaattgttctctcccagttctccaacaatcc-3' (SEQ ID NO: 60 trong danh mục trình tự)

Đoạn môi 23

5'-aaacgtacgtttcagctccagcttggtcccagttaccg-3' (SEQ ID NO: 61 trong danh mục trình tự)

7)-5 Cấu trúc của vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu thể khảm M30

Bằng cách sử dụng cADN mã hóa chuỗi nặng của kháng thể chuột nhắt M30 dùng làm khuôn, đoạn ADN thu được bằng tiến hành PCR sử dụng KOD-Plus- (TOYOBO, Co., Ltd.) và bộ đoạn môi sau A được gắn với đoạn ADN thu được bằng tiến hành PCR sử dụng bộ đoạn môi sau B thông qua PCR mở rộng chồng lặp sử dụng bộ đoạn môi sau C, nhờ đó BspI trong vùng biến đổi được tách loại và vùng này cũng bao gồm cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng được khuếch đại. Đoạn ADN thu được bằng cách tách sản phẩm được khuếch đại bằng enzym giới hạn BspI được chèn vào trong vector biểu hiện chuỗi nặng của kháng thể được làm giống người và thể khảm nói chung (pEF1FCCU) ở vị trí tách được bằng enzym giới hạn BspI, nhờ đó vector biểu hiện chuỗi nặng kiểu thể khảm M30 được cấu trúc. Do đó vector biểu hiện thu được được đặt tên là “pEF1FCCU/M30H”.

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kiểu thể khảm M30 được nêu trong SEQ

ID NO: 62 trong danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 63. Ngoài ra, các trình tự của các SEQ ID NO: 62 và 63 được thể hiện trong Fig.26.

Bộ đoạn mồi A

Đoạn mồi 24

5'-aaagctgagcgaggtccagctgcagcagctctggacctgag-3' (SEQ ID NO: 64 trong danh mục trình tự)

Đoạn mồi 25

5'-gaggtcaggctgctgagttccatgtaggctgtgctg-3' (SEQ ID NO: 65 trong danh mục trình tự)

Bộ đoạn mồi B

Đoạn mồi 26

5'-cagcacagcctacatggaactcagcagcctgacctc-3' (SEQ ID NO: 66 trong danh mục trình tự)

Đoạn mồi 27

5'-aaagctgagctgactgtgagagtggccttggccccag-3' (SEQ ID NO: 67 trong danh mục trình tự)

Bộ đoạn mồi C

Đoạn mồi 28

5'-aaagctgagcgaggtccagctgcagcagctctggacctgag-3' (SEQ ID NO: 68 trong danh mục trình tự)

Đoạn mồi 29

5'-aaagctgagctgactgtgagagtggccttggccccag-3' (SEQ ID NO: 69 trong danh mục trình tự)

7)-6 Điều chế kháng thể khảm M30

7)-6-1 Sản xuất kháng thể khảm M30

$1,2 \times 10^9$ tế bào của các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) trong pha tăng trưởng logarit được tạo hạt trong 1,2 l môi trường biểu hiện FreeStyle 293 mới (Invitrogen Corporation) và được nuôi cấy trong 1 giờ bằng cách lắc ở 90 vòng/phút ở 37°C trong lò ủ 8% CO₂. 3,6 mg polyetylenimin (Polyscience #24765) được hòa tan trong 20 ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Sau đó, pEF1FCCU/M30H (0,4 mg) và pEF6KCL/M30L (0,8 mg) được điều chế bằng kit plasmid PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) được tạo huyền phù trong 20 ml môi trường Opti-Pro SFM. Sau đó, 20 ml dung dịch hỗn hợp vector biểu hiện /Opti-Pro SFM thu được được bổ sung vào 20 ml dung dịch hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM thu được, và hỗn hợp thu được được khuấy nhẹ và sau đó được để yên trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung vào các tế bào FreeStyle 293F, và lắc môi trường nuôi cấy ở 90 vòng/phút được tiến hành trong 7 ngày ở 37°C trong thiết bị ủ 8% CO₂. Dịch nổi môi trường nuôi cấy thu được được lọc qua thiết bị lọc nang dùng một lần (Advantec #CCS-045-E1H).

Kháng thể khảm M30 thu được bởi dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30H và pEF6KCL/M30L được đặt tên là “cM30” hoặc “kháng thể cM30”.

7)-6-2 Tinh chế cM30

Dịch nổi môi trường nuôi cấy thu được trong ví dụ 7)-6-1) được tinh chế bằng quy trình hai bước bao gồm sắc ký ái lực rProtein A (ở 4 đến 6°C) (GE Healthcare Japan Corporation) và hydroxyapatit gồm (ở nhiệt độ trong phòng). Bước thay đổi đệm sau khi tinh chế bằng sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng. Đầu tiên, 1100 đến 1200 ml dịch nổi môi trường nuôi cấy được đưa lên cột MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, hai cột HiTrap (thể tích: 1 ml) được nối nối tiếp) được làm cân bằng bằng PBS. Sau khi toàn bộ dung dịch nuôi cấy được rót vào trong cột này, cột này được rửa bằng 15 đến 30 ml PBS. Sau đó, việc rửa giải được tiến hành bằng dung dịch arginin hydroclorua 2M (pH 4,0), và phân đoạn chứa kháng thể được thu gom. Phân đoạn này được đưa lên cột tách muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, hai cột tách muối HiTrap (thể tích: 5 ml) được nối nối tiếp), nhờ đó dung dịch đệm được thay đổi bằng dung dịch đệm chứa 5 mM natri phosphat, 50 mM MES, và 20 mM NaCl ở pH 6,5.

Ngoài ra, dung dịch kháng thể được thay đổi dung dịch đệm được chuyển lên cột hydroxyapatit gồm (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., cột Bio-Scale CHT2-1 hydroxyapatit (thể tích: 2 ml)) được làm cân bằng bằng dung dịch đệm chứa 5 mM

NaPi, 50 mM MES, và 20 mM NaCl ở độ pH 6,5. Sau đó, việc rửa giải gradient nồng độ tuyến tính bằng natri clorua được tiến hành, và phân đoạn chứa kháng thể được thu gom. Phân đoạn này được đưa lên cột tách muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, haic ột tách muối HiTrap (thể tích: 5 ml) được nối nối tiếp), nhờ đó dịch lỏng được thay đổi bằng CBS (chứa 10 mM dung dịch đệm xitrat và 140 mM natri clorua, pH 6,0).

Cuối cùng, dung dịch thu được được cô đặc sử dụng thiết bị lọc Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN 20 (trọng lượng phân tử riêng phần: 30 K, Sartorius Co., Ltd., ở 4°C), và nồng độ của IgG được điều chỉnh đến 1,0 mg/ml hoặc lớn hơn, và dung dịch thu được được sử dụng làm mẫu tinh khiết.

Ví dụ 8. Hoạt tính của kháng thể cM30

8)-1 Hoạt tính liên kết của kháng thể cM30 với B7-H3

Ái lực giữa kháng thể M30 hoặc kháng thể cM30 và kháng nguyên B7-H3 được đo bằng thiết bị cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (GE Healthcare Corporation). Bằng các phương pháp thông thường, kháng thể IgG kháng chuột hoặc kháng người được làm bất động trên chip cảm biến, và sau đó, mẫu kháng thể M30 hoặc kháng thể cM30 được liên kết trên đó. Sau đó, polypeptit vùng ngoại bào của kháng nguyên biến thể 2 tái tổ hợp của B7-H3 (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc., #2318-B3-050/CF) được bổ sung vào đó ở các nồng độ khác nhau, và lượng kháng nguyên được liên kết với kháng thể trong dung dịch đệm luân phiên (dung dịch đệm phosphat, 0,05% SP20) được đo trong suốt thời gian thử nghiệm. Lượng đo được được phân tích bằng phần mềm riêng (BIAevaluation Version 4,1, GE Healthcare Corporation) và hằng số phân ly được tính.

Kết quả là, kháng thể M30 và kháng thể cM30 được cho là liên kết với kháng nguyên B7-H3 tái tổ hợp với hằng số phân ly lần lượt bằng 5,89 nM và 3,43 nM. Từ các kết quả này, đã khẳng định được rằng kháng thể M30 và kháng thể cM30 liên kết với kháng nguyên B7-H3 và ái lực liên kết của chúng về cơ bản bằng nhau.

8)-2 Hoạt tính ADCP của kháng thể cM30

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMCs) của đối tượng khỏe mạnh được tách bằng các phương pháp thông thường và được tạo huyền phù trong RPMI 1640 chứa 10% FBS (Invitrogen Corporation) và sau đó được tạo hạt trong bình cầu. Các tế bào được nuôi cấy qua đêm trong thiết bị ủ CO₂. Dịch nổi môi trường nuôi cấy

được tách loại, và đối với các tế bào còn lại trong bình cầu, RPMI 1640 chứa 10% FBS được bổ sung M-CSF và GM-CSF (PeproTech, Inc.) được bổ sung, và các tế bào được nuôi cấy trong 2 tuần. Các tế bào được tách bằng TrypLE và được thu gom. Sau đó, các tế bào được bổ sung vào đĩa 24 lỗ ở 500 μ l/lỗ (1×10^5 tế bào/lỗ) và được nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Do đó các tế bào thu được được sử dụng làm tế bào cảm ứng.

Việc đánh dấu các tế bào NCI-H322 được dùng làm các tế bào đích được tiến hành sử dụng kit đánh dấu nhuộm màu PKH26 (Sigma Co., Ltd.). Các tế bào đích được tách bằng TrypLE và được rửa hai lần bằng PBS. Các tế bào được tạo huyền phù trong dung dịch pha loãng C ở 1×10^7 tế bào/ml. Khối nhuộm màu PKH26 (1 mM) được pha loãng tới 8 μ M bằng dung dịch pha loãng C, và ngay lập tức sau đó, dung dịch nhuộm màu loãng được bổ sung vào đó với lượng bằng với lượng huyền phù tế bào. Hỗn hợp thu được được đặt ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, 1 ml huyết thanh được bổ sung vào đó, và ngoài ra, môi trường chứa huyết thanh được bổ sung vào đó, và việc rửa được tiến hành hai lần.

Mỗi kháng thể M30 và kháng thể cM30 được pha loãng tới 20 μ g/ml bằng dung dịch nuôi cấy. Sau đó, các tế bào đích được phân tán ở 2×10^6 tế bào/100 μ l/ống và được trộn. Hỗn hợp thu được được để yên trên đá trong 30 phút. Dịch nổi được tách loại, và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch nuôi cấy và được tạo huyền phù trong 500 μ l dung dịch nuôi cấy. Dịch nổi được tách loại từ tế bào cảm ứng, và các tế bào được xử lý với kháng thể và được tạo huyền phù trong dung dịch nuôi cấy được bổ sung vào đó và được trộn trong đó. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong 3 giờ trong thiết bị ủ CO₂. Sau đó, các tế bào được tách bằng Trypsin-EDTA và được thu gom. Đối với các tế bào được thu gom này, kháng thể CD11b kháng chuột được đánh dấu bằng FITC (Becton, Dickinson và Company, Ltd.) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được để yên trên đá trong 30 phút. Dịch nổi được tách loại, và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch nuôi cấy. Các tế bào thu gom được tạo huyền phù trong 300 μ l môi trường nuôi cấy và được phân tích bằng FACS Calibur (Becton, Dickinson và Company, Ltd.). Trong các đại thực bào dương tính với CD11b, phân đoạn dương tính với PKH26 được đánh giá dùng làm các tế bào dương tính với thực bào.

Kết quả là, như được chỉ ra trong Fig.8, khi kháng thể M30 và kháng thể cM30 được bổ sung ở 10 μ g/ml, thực bào của các tế bào NCI-H322 bởi các đại thực bào được cảm ứng tới $33 \pm 1\%$ và $35 \pm 2\%$. Theo đó, đã cho thấy rằng kháng thể

cM30 có hoạt tính ADCP kháng tế bào NCI-H322 theo phương pháp tương tự dùng làm kháng thể M30. Kết quả thực nghiệm tương tự cũng thu được đối với hoạt tính ADCP kháng các tế bào MDA-MB-231 (ATCC).

8)-3 Tác dụng chống khối u *in vivo* của kháng thể cM30

Các tế bào MDA-MB-231 được tách ra khỏi bình cầu nuôi cấy bằng cách xử lý bằng trypsin, và sau đó được tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS (Invitrogen Corporation), sau đó bằng cách ly tâm và dịch nổi được tách loại. Các tế bào được rửa hai lần bằng môi trường tương tự, và sau đó được tạo huyền phù trong BD Matrigel Basement Membrane Matrix (được sản xuất bởi BD Biosciences, Inc.). Sau đó, các tế bào được cấy dưới da trong vùng nách của mỗi con chuột nhắt (CB17/Icr-Prkdc[scid]/CrlCrlj, Charles River Laboratories Japan, Inc.) ở 6 tuần tuổi với liều dùng bằng 5×10^6 tế bào/chuột nhắt. Ngày cấy được tính từ ngày 0, và vào ngày 14, 21, 28, 35, và 42, kháng thể M30 hoặc kháng thể cM30 được sử dụng trong bụng ở liều dùng bằng 500 μ g/chuột nhắt (khoảng 25 mg/kg). Thể tích khối u được đo vào ngày 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 42, 46, 49, và 52, và hiệu quả chống khối u của việc sử dụng kháng thể này được đánh giá.

Kết quả là, trong các nhóm sử dụng kháng thể M30 và cM30, sự tăng trưởng khối u được hạn chế một cách đáng kể khi được so sánh với nhóm không được xử lý mà trong đó kháng thể không được sử dụng. Các giá trị P đối với kháng thể M30 và kháng thể cM30 được so sánh với nhóm không được xử lý về trọng lượng khối u vào ngày thứ 52 đều là $P < 0,001$. Các giá trị P được tính sử dụng thử nghiệm đa so sánh Dunnett.

Ngoài ra, tỷ lệ ức chế sự tăng trưởng của khối u ($= 100 - (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm sử dụng kháng thể}) / (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm không được xử lý}) \times 100$) vào ngày thứ 52 là 71,3% trong trường hợp của kháng thể M30 và 71,7% trong trường hợp của kháng thể cM30. Theo đó, kháng thể cM30 thu được có hiệu quả chống khối u rất mạnh *in vivo* theo phương pháp tương tự dùng làm kháng thể M30 (Fig.9).

Ví dụ 9. Thiết kế kháng thể được làm giống người của kháng thể kháng B7-H3 người của chuột nhắt #M30

9)-1 Thiết kế kháng thể M30 được làm giống người

9)-1-1 Mô hình hóa phân tử của vùng biến đổi M30

Phương pháp mô hình hóa phân tử của các vùng biến đổi M30 được tiến hành theo phương pháp đã biết thông thường dùng làm phương pháp mô hình hóa đồng đều (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Các trình tự bậc một (cấu trúc ba chiều có nguồn gốc từ cấu trúc tinh thể tia X là có sẵn) của các vùng biến đổi globulin miễn dịch ở người được đăng ký trong Ngân hàng dữ liệu protein (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)) được so sánh với các vùng biến đổi M30 được xác định trong ví dụ 6-3).

Kết quả là, 3BKY được dùng làm trình tự có độ tương đồng trình tự cao nhất với vùng biến đổi chuỗi nhẹ của M30 trong số các kháng thể mà có sự mất đoạn trong khung một cách tương tự. Ngoài ra, 3DGG được dùng làm trình tự có độ tương đồng trình tự cao nhất với vùng biến đổi chuỗi nặng M30.

Cấu trúc ba chiều của vùng khung được tạo ra dựa trên “mô hình khung” bằng cách kết hợp các tọa độ của 3BKY tương ứng với chuỗi nhẹ của M30 với các tọa độ của 3DGG tương ứng với chuỗi nặng của M30. Đối với các CDR của M30, dùng làm tọa độ xác định cấu dạng gần giống nhất với cấu dạng của CDRH1 (SEQ ID NO: 92), CDRH2 (SEQ ID NO: 93), CDRH3 (SEQ ID NO: 94), CDRL1 (SEQ ID NO: 95), CDRL2 (SEQ ID NO: 96), và CDRL3 (SEQ ID NO: 97) theo cách phân loại của Thornton và các đồng tác giả (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)) và quy tắc H3 (FEBS letters 399, 1-8 (1996)), 2HOJ, 1BBD, 1Q9O, 2FBJ, 1LNK, và 1TET lần lượt được chọn, và được kết hợp trong mô hình khung.

Cuối cùng, để thu được mô hình phân tử có thể của vùng biến đổi của M30 về năng lượng, việc tính toán năng lượng được tiến hành để loại trừ sự tiếp xúc nội phân tử bất lợi. Phương pháp nêu trên được tiến hành sử dụng chương trình dự đoán cấu trúc bậc ba của protein có bán trên thị trường Prime và chương trình tra cứu tọa độ MacroModel (Schrodinger, LLC).

9)-1-2 Thiết kế trình tự axit amin của M30 được làm giống người

Kháng thể M30 được làm giống người được cấu trúc theo phương pháp chung đã biết như ghép CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

Kháng thể thể nhận chọn dựa trên độ đồng nhất của axit amin trong vùng khung. Trình tự của vùng khung của M30 được so sánh với toàn các trình tự khung ở người trong dữ liệu Kabat Database (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) về các trình tự axit amin của kháng thể. Kết quả là, kháng thể mAb49'CL (GenBank in

NCBI: D16838,1 và D16837,1) được dùng làm thể nhận dựa trên sự đồng nhất trình tự bằng 70% trong vùng khung.

Các gốc axit amin trong vùng khung của mAb49'CL là thẳng hàng với các gốc axit amin của M30, và các vị trí ở đó axit amin khác nhau được sử dụng được xác định. Các vị trí của các gốc này được phân tích sử dụng mô hình ba chiều của M30 được cấu trúc như trên. Sau đó, các gốc thể cho được ghép trên thể nhận được lựa chọn theo tiêu chuẩn được tạo ra bởi Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Bằng cách chuyển một số gốc thể cho được chọn tới kháng thể thể nhận, các trình tự của kháng thể M30 được làm giống người được cấu trúc như được mô tả trong ví dụ sau.

9)-2 Làm giống người chuỗi nặng của M30

9)-2-1 Chuỗi nặng kiểu M30-H1:

Chuỗi nặng của M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 20 (axit glutamic), 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 35 (alanin), 39 (methionin), 57 (lysin), 59 (lysin), 67 (isoleuxin), 86 (lysin), 87 (alanin), 89 (glutamin), 91 (serin), 93 (lysin), 95 (serin), 106 (threonin), 110 (serin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 63 trong danh mục trình tự với glutamin, valin, alanin, valin, lysin, serin, valin, arginin, alanin, methionin, arginin, valin, isoleuxin, alanin, axit glutamic, threonin, arginin, threonin, leuxin, và valin, respectively, được đặt tên là “chuỗi nặng loại M30-H1”.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H1 được nêu trong SEQ ID NO: 85.

9)-2-2 Chuỗi nặng loại M30-H2:

Chuỗi nặng của M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 20 (axit glutamic), 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 35 (alanin), 39 (methionin), 57 (lysin), 59 (lysin), 86 (lysin), 87 (alanin), 89 (glutamin), 91 (serin), 93 (lysin), 95 (serin), 106 (threonin), 110 (serin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 63 trong danh mục trình tự tương ứng với glutamin, valin, alanin, valin, lysin, serin, valin, arginin, alanin, arginin, valin, isoleuxin, alanin, axit glutamic, threonin, arginin, threonin, leuxin, và valin, được đặt tên là “chuỗi nặng loại M30-H2”.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H2 được nêu trong SEQ ID NO: 87.

9)-2-3 Chuỗi nặng loại M30-H3:

Chuỗi nặng của M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 35 (alanin), 39 (methionin), 59 (lysin), 89 (glutamin), 91 (serin), 93 (lysin), 95 (serin), 106 (threonin), 110 (serin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 63 trong danh mục trình tự tương ứng với valin, alanin, valin, lysin, serin, valin, alanin, isoleuxin, alanin, axit glutamic, threonin, arginin, threonin, leuxin, và valin, được đặt tên là “chuỗi nặng loại M30-H3”.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H3 được nêu trong SEQ ID NO: 89.

9)-2-4 Chuỗi nặng loại M30-H4:

Chuỗi nặng của M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 24 (glutamin), 28 (prolin), 30 (leuxin), 31 (valin), 35 (alanin), 39 (methionin), 59 (lysin), 95 (serin), 106 (threonin), 110 (serin), 136 (threonin), và 137 (leuxin) của chuỗi nặng cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 63 trong danh mục trình tự tương ứng với valin, alanin, valin, lysin, serin, valin, alanin, threonin, arginin, threonin, leuxin, và valin, được đặt tên là “chuỗi nặng loại M30-H4”.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H4 được nêu trong SEQ ID NO: 91.

9)-3 Làm giống người chuỗi nhẹ M30

9)-3-1 Chuỗi nhẹ loại M30-L1:

Chuỗi nhẹ M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 21 (glutamin), 25 (serin), 29 (threonin), 30 (isoleuxin), 33 (alanin), 38 (lysin), 39 (valin), 41 (methionin), 42 (threonin), 61 (serin), 62 (serin), 64 (lysin), 65 (prolin), 66 (tryptophan), 77 (valin), 89 (serin), 90 (tyrosin), 91 (serin), 97 (valin), 99 (alanin), 102 (alanin), 104 (threonin), 119 (threonin), 123 (leuxin), và 125 (leuxin) của chuỗi nhẹ cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự tương ứng với axit glutamic, threonin, alanin, threonin, leuxin, arginin, alanin, leuxin, serin, glutamin, alanin, arginin, leuxin, leuxin, isoleuxin, axit aspartic, phenylalanin,

threonin, leuxin, prolin, phenylalanin, valin, glutamin, valin, và isoleuxin, được đặt tên là “chuỗi nhẹ loại M30-L1”.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L1 được nêu trong SEQ ID NO: 71.

9)-3-2 Chuỗi nhẹ loại M30-L2:

Chuỗi nhẹ M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 21 (glutamin), 25 (serin), 29 (threonin), 30 (isoleuxin), 33 (alanin), 38 (lysin), 39 (valin), 41 (methionin), 42 (threonin), 61 (serin), 62 (serin), 64 (lysin), 65 (prolin), 77 (valin), 89 (serin), 91 (serin), 97 (valin), 99 (alanin), 102 (alanin), 104 (threonin), 119 (threonin), 123 (leuxin), và 125 (leuxin) của chuỗi nhẹ cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự tương ứng với axit glutamic, threonin, alanin, threonin, leuxin, arginin, alanin, leuxin, serin, glutamin, alanin, arginin, leuxin, isoleuxin, axit aspartic, threonin, leuxin, prolin, phenylalanin, valin, glutamin, valin, và isoleuxin, được đặt tên là “chuỗi nhẹ loại M30-L2”.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L2 được nêu trong SEQ ID NO: 73.

9)-3-3 Chuỗi nhẹ loại M30-L3:

Chuỗi nhẹ M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 29 (threonin), 30 (isoleuxin), 33 (alanin), 38 (lysin), 39 (valin), 41 (methionin), 62 (serin), 65 (prolin), 77 (valin), 91 (serin), 97 (valin), 99 (alanin), 102 (alanin), 104 (threonin), 119 (threonin), 123 (leuxin), và 125 (leuxin) của chuỗi nhẹ cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự tương ứng với alanin, threonin, leuxin, arginin, alanin, leuxin, alanin, leuxin, isoleuxin, threonin, leuxin, prolin, phenylalanin, valin, glutamin, valin, và isoleuxin, được đặt tên là “chuỗi nhẹ loại M30-L3”.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L3 được nêu trong SEQ ID NO: 75.

9)-3-4 Chuỗi nhẹ loại M30-L4:

Chuỗi nhẹ M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 21 (glutamin), 25 (serin), 29 (threonin), 30 (isoleuxin), 33 (alanin), 38 (lysin), 39 (valin), 41 (methionin), 42 (threonin), 61 (serin), 62 (serin), 64 (lysin), 66

(tryptophan), 77 (valin), 89 (serin), 90 (tyrosin), 91 (serin), 96 (arginin), 97 (valin), 99 (alanin), 102 (alanin), 104 (threonin), 119 (threonin), 123 (leuxin), và 125 (leuxin) của chuỗi nhẹ cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự tương ứng với axit glutamic, threonin, alanin, threonin, leuxin, arginin, alanin, leuxin, serin, glutamin, alanin, arginin, leuxin, isoleuxin, axit aspartic, phenylalanin, threonin, serin, leuxin, prolin, phenylalanin, valin, glutamin, valin, và isoleuxin, được đặt tên là “chuỗi nhẹ loại M30-L4”.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L4 được nêu trong SEQ ID NO: 77.

9)-3-5 Chuỗi nhẹ loại M30-L5:

Chuỗi nhẹ M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 29 (threonin), 30 (isoleuxin), 33 (alanin), 38 (lysin), 39 (valin), 41 (methionin), 62 (serin), 77 (valin), 91 (serin), 97 (valin), 99 (alanin), 102 (alanin), 104 (threonin), 119 (threonin), 123 (leuxin), và 125 (leuxin) của chuỗi nhẹ cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự tương ứng với alanin, threonin, leuxin, arginin, alanin, leuxin, alanin, isoleuxin, threonin, leuxin, prolin, phenylalanin, valin, glutamin, valin, và isoleuxin, được đặt tên là “chuỗi nhẹ loại M30-L5”.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L5 được nêu trong SEQ ID NO: 79.

9)-3-6 Chuỗi nhẹ loại M30-L6-:

Chuỗi nhẹ M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 21 (glutamin), 25 (serin), 29 (threonin), 30 (isoleuxin), 33 (alanin), 38 (lysin), 39 (valin), 41 (methionin), 42 (threonin), 61 (serin), 62 (serin), 64 (lysin), 66 (tryptophan), 77 (valin), 89 (serin), 90 (tyrosin), 91 (serin), 97 (valin), 99 (alanin), 102 (alanin), 104 (threonin), 119 (threonin), 123 (leuxin), và 125 (leuxin) của chuỗi nhẹ cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự tương ứng với axit glutamic, threonin, alanin, threonin, leuxin, arginin, alanin, leuxin, serin, glutamin, alanin, arginin, leuxin, isoleuxin, axit aspartic, phenylalanin, threonin, leuxin, prolin, phenylalanin, valin, glutamin, valin, và isoleuxin, được đặt tên là “chuỗi nhẹ loại M30-L6”.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L6 được nêu trong SEQ ID NO:

81.

9)-3-7 Chuỗi nhẹ loại M30-L7:

Chuỗi nhẹ M30 được làm giống người được thiết kế bằng cách thay thế các số axit amin 21 (glutamin), 25 (serin), 29 (threonin), 30 (isoleuxin), 33 (alanin), 38 (lysin), 39 (valin), 41 (methionin), 42 (threonin), 61 (serin), 62 (serin), 64 (lysin), 66 (tryptophan), 77 (valin), 89 (serin), 91 (serin), 97 (valin), 99 (alanin), 102 (alanin), 104 (threonin), 119 (threonin), 123 (leuxin), và 125 (leuxin) của chuỗi nhẹ cM30 được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong danh mục trình tự tương ứng với axit glutamic, threonin, alanin, threonin, leuxin, arginin, alanin, leuxin, serin, glutamin, alanin, arginin, leuxin, isoleuxin, axit aspartic, threonin, leuxin, prolin, phenylalanin, valin, glutamin, valin, và isoleuxin, được đặt tên là “chuỗi nhẹ loại M30-L7”.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L7 được nêu trong SEQ ID NO: 83.

(Ví dụ 10) Sản xuất kháng thể được làm giống người

10)-1 Cấu trúc của vector biểu hiện chuỗi nhẹ loại M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6, và M30-L7

Các ADN bao gồm gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ loại M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6, hoặc M30-L7 có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 71, các số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 73, các số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 75, các số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 77, các số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 79, các số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 81, hoặc các số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 83 trong danh mục trình tự được tổng hợp (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service) dựa trên các SEQ ID NO: 70, 72, 74, 76, 78, 80, và 82 theo các trình tự nucleotit tương ứng với các SEQ ID NO theo các trình tự axit amin. Sau đó, mỗi đoạn ADN thu được bằng cách tách ADN tổng hợp được bằng các enzym giới hạn NdeI và BsiWI được chèn vào trong vector biểu hiện chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống người và thể khảm nói chung (pEF6KCL) ở vị trí tách được bằng các enzym giới hạn NdeI và BsiWI, nhờ đó các vector biểu hiện chuỗi nhẹ loại M30-L1, M30-L2, M30-L3, M30-L4, M30-L5, M30-L6, và M30-L7 được cấu trúc.

Do đó các vector biểu hiện thu được được đặt tên lần lượt là

“pEF6KCL/M30-L1”, “pEF6KCL/M30-L2”, “pEF6KCL/M30-L3”,
 “pEF6KCL/M30-L4”, “pEF6KCL/M30-L5”, “pEF6KCL/M30-L6”, và
 “pEF6KCL/M30-L7”.

10)-2 Cấu trúc của các vector biểu hiện chuỗi nặng loại M30-H1, M30-H2, M30-H3, và M30-H4

Các ADN bao gồm gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng loại M30-H1, M30-H2, M30-H3, hoặc M30-H4 có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85, các số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 87, các số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 89, hoặc các số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 trong danh mục trình tự được tổng hợp (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service) dựa trên SEQ ID NO: 84, 86, 88, và 90 theo các trình tự nucleotit tương ứng với các SEQ ID NO theo trình tự axit amin. Sau đó, mỗi đoạn ADN thu được bằng cách tách ADN tổng hợp được bằng enzym giới hạn BlnI được chèn vào trong vector biểu hiện chuỗi nặng của kháng thể được làm giống người nói chung (pEF1FCCU) ở vị trí tách được bằng enzym giới hạn BlnI, nhờ đó các vector biểu hiện chuỗi nặng loại M30-H1, M30-H2, M30-H3, và M30-H4 được cấu trúc.

Do đó vector biểu hiện thu được được đặt tên lần lượt là “pEF1FCCU/M30-H1”, “pEF1FCCU/M30-H2”, “pEF1FCCU/M30-H3”, và “pEF1FCCU/M30-H4”.

10)-3 Sản xuất kháng thể được làm giống người

$1,2 \times 10^9$ tế bào của các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) trong pha tăng trưởng logarit được tạo hạt trong 1,2 l môi trường biểu hiện FreeStyle 293 mới (Invitrogen Corporation) và được nuôi cấy trong 1 giờ bằng cách lắc ở 90 vòng/phút ở 37°C trong thiết bị ủ 8% CO₂. 3,6 mg polyetylenimin (Polyscience #24765) được hòa tan trong 20 ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Sau đó, vector biểu hiện chuỗi nặng (0,4 mg) và vector biểu hiện chuỗi nhẹ (0,8 mg) điều chế được bằng kit plasmid PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) được tạo huyền phù trong 20 ml môi trường Opti-Pro SFM. Sau đó, 20 ml dung dịch hỗn hợp gồm vector biểu hiện /Opti-Pro SFM thu được được bổ sung vào 20 ml dung dịch hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM, và hỗn hợp thu được được khuấy nhẹ và sau đó được để yên trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung vào các tế bào FreeStyle 293F, và lắc môi trường nuôi cấy ở 90 vòng/phút được tiến hành trong 7 ngày ở 37°C trong thiết bị ủ 8% CO₂. Dịch nổi môi trường nuôi cấy thu

được được lọc qua thiết bị lọc nang dùng một lần (Advantec #CCS-045-E1H).

Kháng thể được làm giống người của M30 thu được bởi dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H1 và pEF6KCL/M30-L1 được đặt tên là “M30-H1-L1”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H1 và pEF6KCL/M30-L2 được đặt tên là “M30-H1-L2”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H1 và pEF6KCL/M30-L3 được đặt tên là “M30-H1-L3”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H1 và pEF6KCL/M30-L4 được đặt tên là “M30-H1-L4”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H4 và pEF6KCL/M30-L1 được đặt tên là “M30-H4-L1”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H4 và pEF6KCL/M30-L2 được đặt tên là “M30-H4-L2”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H4 và pEF6KCL/M30-L3 được đặt tên là “M30-H4-L3”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H4 và pEF6KCL/M30-L4 được đặt tên là “M30-H4-L4”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H1 và pEF6KCL/M30-L5 được đặt tên là “M30-H1-L5”, kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H1 và pEF6KCL/M30-L6 được đặt tên là “M30-H1-L6”, và kháng thể được làm giống người của M30 thu được bằng dạng kết hợp của pEF1FCCU/M30-H1 và pEF6KCL/M30-L7 được đặt tên là “M30-H1-L7”.

10)-4 Tinh chế kháng thể được làm giống người

Dịch nổi môi trường nuôi cấy thu được trong ví dụ 10)-3 được tinh chế bằng quy trình hai bước bao gồm sắc ký ái lực rProtein A (ở 4 đến 6°C) và hydroxyapatit gồm (ở nhiệt độ trong phòng). Bước thay đổi đệm sau khi tinh chế bằng sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng.

Đầu tiên, 1100 đến 1200 ml dịch nổi môi trường nuôi cấy được chuyển lên các cột MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột HiTrap (thể tích: 1 ml) được nối nối tiếp) được làm cân bằng bằng PBS. Sau khi toàn bộ dung dịch nuôi cấy được rót vào trong cột này, cột này được rửa bằng 15 đến 30 ml PBS. Sau đó, việc rửa giải được tiến hành bằng dung dịch arginin

hydroclorua 2M (pH 4,0), và phân đoạn chứa kháng thể được thu gom. Phân đoạn này được đưa lên cột tách muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột tách muối HiTrap (thể tích: 5 ml) được nối nối tiếp), nhờ đó dung dịch đệm được thay đổi bằng dung dịch đệm chứa natri phosphat 5mM, MES 50 mM, và NaCl 20 mM ở độ pH 6,5.

Ngoài ra, dung dịch kháng thể được thay đổi dung dịch đệm được chuyển lên cột hydroxyapatit gồm (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., cột Bio-Scale CHT2-1 hydroxyapatit (thể tích: 2 ml)) được làm cân bằng bằng dung dịch đệm chứa NaPi 5 mM, MES 50 mM, và NaCl 20 mM ở độ pH 6,5. Sau đó, gradient rửa giải nồng độ tuyến tính của natri clorua được tiến hành, và phân đoạn chứa kháng thể được thu gom.

Phân đoạn này được đưa lên cột tách muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., hai cột cách muối HiTrap (thể tích: 5 ml) được nối nối tiếp), nhờ đó dịch lỏng được thay đổi bằng CBS (chứa dung dịch đệm xitrat 10 mM và natri clorua 140 mM, pH 6,0).

Cuối cùng, dung dịch thu được được cô đặc sử dụng thiết bị Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN 20 (trọng lượng phân tử riêng phần: 30 K, Sartorius Co., Ltd., ở 4°C), và nồng độ của IgG được điều chỉnh đến 1,0 mg/ml hoặc lớn hơn, và do đó, dung dịch thu được được sử dụng làm mẫu tinh khiết.

10)-5 Tính chất liên kết của kháng thể được làm giống người đối với kháng nguyên B7-H3

Đặc tính liên kết của kháng thể M30 được làm giống người với B7-H3 người mà là kháng nguyên được đo bằng thiết bị cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (Biacore, Inc.). Bằng các phương pháp thông thường, kháng thể IgG kháng người được làm bất động trên chip cảm biến, và sau đó, mỗi mẫu tinh khiết của kháng thể M30 được làm giống người thu được trong mục 10)-4 nêu trên được liên kết ở đó. Sau đó, polypeptit vùng ngoại bào của biến thể 2 của kháng nguyên B7-H3 (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc., #2318-B3-050/CF) được bổ sung vào đó ở các nồng độ khác nhau, và lượng kháng nguyên được liên kết với kháng thể trong dung dịch đệm luân phiên (dung dịch đệm phosphat, 0,05% SP20) được đo trong suốt thời gian tiến hành thử nghiệm. Lượng đo được được phân tích bằng phần mềm riêng (BIAevaluation) và hằng số phân ly (K_d [M]) được tính. Việc đo được tiến hành sử dụng kháng thể cM30 dùng làm đối chứng dương cho mỗi phép đo. Các kết quả

được thể hiện trong bảng 3. Toàn bộ các kháng thể M30 được làm giống người có hoạt tính liên kết kháng kháng nguyên B7-H3.

Bảng 3

	Kd [M]
M30-H1-L1	8,7E-08
M30-H1-L2	1,0E-07
M30-H1-L3	1,0E-07
M30-H1-L4	1,6E-08
M30-H4-L1	1,3E-07
M30-H4-L2	1,4E-07
M30-H4-L3	1,6E-07
M30-H4-L4	1,2E-08
M30-H1-L5	1,9E-09
M30-H1-L6	3,4E-09
M30-H1-L7	2,7E-09
cM30	7,3E-10

Ví dụ 11. Đo hoạt tính ức chế cạnh tranh của kháng thể cM30 và kháng thể M30 được làm giống người kháng kháng thể M30 đối với quá trình liên kết với kháng nguyên B7-H3

Hoạt tính ức chế cạnh tranh của kháng thể cM30 và kháng thể M30 được làm giống người (kháng thể M30-H1-L4) kháng kháng thể M30 đối với quá trình liên kết với biến thể 1 và biến thể 2 của B7-H3 được đo bằng phương pháp sau.

Bằng cách sử dụng kit biotin hóa EZ-Link Sulfo-NHS-LC (được sản xuất bởi Thermo Scientific Corporation, #21435) và theo hướng dẫn đính kèm, kháng thể M30 đơn dòng chuột nhất tương ứng được biotin hóa (dưới đây, kháng thể M30 được biotin hóa tương ứng được gọi là “bM30”). Ngoài ra, khi dung dịch đệm được sử dụng trong phương pháp ELISA, BD OPTI EIA sau (BD Biosciences, Inc., #550536) được sử dụng trong tất cả các trường hợp.

Mỗi polypeptit vùng ngoại bào của biến thể 1 của B7-H3 (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc., #1949-B3-050/CF) và polypeptit vùng ngoại bào của biến thể 2 của B7-H3 (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc., #2318-B3-050/CF) được pha

loãng tới 0,5 $\mu\text{g/ml}$ bằng dung dịch đệm phủ và dung dịch thu được được phân tán ở 100 $\mu\text{l/lỗ}$ trong đĩa miễn dịch (được sản xuất bởi Nunc, Inc., #442404). Sau đó, đĩa được để yên qua đêm ở 4°C, nhờ đó protein được hấp phụ trên đĩa này. Vào ngày tiếp theo, dịch loãng thử nghiệm được phối ở 200 $\mu\text{l/lỗ}$, và đĩa được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ.

Sau khi dung dịch trong mỗi lỗ được tách loại, dung dịch hỗn hợp chứa kháng thể được biotin hóa ở 5 $\mu\text{g/ml}$ và kháng thể không được đánh dấu ở mỗi nồng độ (0 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, hoặc 125 $\mu\text{g/ml}$) được phân phối với lượng 100 $\mu\text{L/lỗ}$ trong dịch loãng thử nghiệm, và đĩa được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ.

Sau khi mỗi lỗ được rửa hai lần bằng dung dịch đệm rửa, tiếp hợp peroxidaza củ cải đen bằng streptavidin (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, #RPN1231V) được pha loãng tới 500 lần bằng dịch loãng thử nghiệm được bổ sung với lượng 100 $\mu\text{l/lỗ}$, và đĩa được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ.

Sau khi dung dịch trong mỗi lỗ được tách loại và mỗi lỗ được rửa hai lần bằng dung dịch đệm rửa, dung dịch cơ chất được bổ sung với lượng 100 $\mu\text{l/lỗ}$, và phản ứng phát triển màu được cho phép xảy ra trong khi khuấy hỗn hợp phản ứng. Sau khi hoàn thành sự phát triển màu, dung dịch đệm phong bế được bổ sung vào đó ở 100 $\mu\text{l/lỗ}$ để làm ngừng phản ứng phát triển màu. Sau đó, độ hấp thụ ở 450 nm được đo sử dụng thiết bị đọc đĩa.

Kết quả là, độ hấp thụ của lỗ mà chỉ bổ sung bM30 là $2,36 \pm 0,05$ (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n=12$)) trong đĩa mà polypeptit của vùng ngoại bào của biến thể 1 của B7-H3 được gắn, và $1,90 \pm 0,20$ (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n=12$)) trong đĩa mà polypeptit của vùng ngoại bào của biến thể 2 của B7-H3 được gắn.

Các giá trị độ hấp thụ trong các đồ thị của Fig.10, mỗi giá trị được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n=3$). IgG đối chứng không ức chế sự liên kết của bM30 với B7-H3.

Mặt khác, đã cho thấy rằng sự liên kết của bM30 với B7-H3 được ức chế bằng chính kháng thể M30, kháng thể cM30, mà là kháng thể khảm của kháng thể M30, và M30-H1-L4, mà là kháng thể được làm giống người, trong cả hai đĩa mà polypeptit của vùng ngoại bào của biến thể 1 của B7-H3 được gắn và đĩa mà

polypeptit của vùng ngoại bào của biến thể 2 của B7-H3 được gắn.

Tức là, đã cho thấy rằng kháng thể cM30 và kháng thể được làm giống người (kháng thể M30-H1-L4) nhận diện cùng một epitop của kháng nguyên B7-H3 dùng làm kháng thể M30.

Ví dụ 12. Hoạt tính của kháng thể M30 được làm giống người

12)-1 Hoạt tính ADCP của kháng thể M30 được làm giống người

Các PBMC của đối tượng khỏe mạnh được tách bằng các phương pháp thông thường và được tạo huyền phù trong RPMI1640 chứa 10% FBS và sau đó được tạo hạt trong bình cầu. Các tế bào được nuôi cấy qua đêm trong thiết bị ủ CO₂. Dịch nổi môi trường nuôi cấy được tách loại, và để các tế bào gắn với bình cầu, RPMI1640 chứa 10% FBS được bổ sung M-CSF và GM-CSF (PeproTech, Inc.) được bổ sung, và các tế bào được nuôi cấy trong 2 tuần. Các tế bào được tách bằng TrypLE và được thu gom. Sau đó, các tế bào được bổ sung vào đĩa 24 lỗ ở 500 µl/lỗ (1×10^5 tế bào/lỗ) và được nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Do đó các tế bào được tạo ra được sử dụng làm tế bào cảm ứng.

Việc đánh dấu tế bào NCI-H322 được dùng làm các tế bào đích được tiến hành sử dụng kit đánh dấu nhuộm màu PKH26 (Sigma Co., Ltd.). Các tế bào đích được tách bằng TrypLE và được rửa hai lần bằng PBS. Các tế bào được tạo huyền phù trong dung dịch pha loãng C ở 1×10^7 tế bào/ml. Khối chất màu PKH26 (1 mM) được pha loãng tới 8 µM bằng dung dịch pha loãng C, và ngay sau đó, dung dịch nhuộm màu loãng được bổ sung vào đó với lượng bằng với lượng huyền phù tế bào. Hỗn hợp thu được được đặt ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, 1 ml huyết thanh được bổ sung vào đó, và sau đó, môi trường chứa huyết thanh được bổ sung vào đó, và việc rửa được tiến hành hai lần.

Mỗi kháng thể M30, kháng thể cM30, và kháng thể M30 được làm giống người (kháng thể M30-H1-L4) được pha loãng tới 20 µg/ml bằng RPMI1640 chứa 10% FBS (Invitrogen Corporation). Sau đó, các tế bào đích (tế bào NCI-H322) được phân tán ở 2×10^6 tế bào/100 µl/ống và được trộn. Hỗn hợp thu được được để yên trên đá trong 30 phút. Dịch nổi được tách loại, và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch nuôi cấy và được tạo huyền phù trong 500 µl dung dịch nuôi cấy.

Dịch nổi được tách loại từ tế bào cảm ứng, và các tế bào được xử lý bằng kháng thể M30, kháng thể cM30, hoặc kháng thể M30 được làm giống người (kháng

thể M30-H1-L4) và được tạo huyền phù trong dung dịch nuôi cấy được bổ sung vào đó và được trộn trong đó. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong 3 giờ trong thiết bị ủ CO₂.

Sau đó, các tế bào được tách bằng Trypsin-EDTA và được thu gom.

Đối với các tế bào được thu gom này, kháng thể CD11b kháng chuột được đánh dấu bằng FITC (Becton, Dickinson và Company, Ltd.) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được để yên trên đá trong 30 phút.

Dịch nổi được tách loại, và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch nuôi cấy.

Các tế bào thu gom được tạo huyền phù trong 300 µl môi trường nuôi cấy và được phân tích bằng thiết bị FACS Calibur (Becton, Dickinson và Company, Ltd.). Trong các đại thực bào dương tính với CD11b, phân đoạn dương tính với PKH26 được đánh giá dùng làm các tế bào dương tính với thực bào.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.11.

Trong nhóm có bổ sung kháng thể M30 được làm giống người (kháng thể M30-H1-L4), hoạt tính ADCP kháng tế bào NCI-H322 thu được theo phương pháp tương tự như trong nhóm bổ sung kháng thể M30 hoặc kháng thể cM30.

12)-2 Hoạt tính ADCC của kháng thể M30 được làm giống người

PBMC của đối tượng khỏe mạnh được tách bằng các phương pháp thông thường và được tạo huyền phù trong RPMI1640 chứa 10% FBS và sau đó được tạo hạt trong bình cầu. Các tế bào được nuôi cấy qua đêm trong thiết bị ủ CO₂.

Các tế bào nổi được thu gom, sau đó bằng cách rửa, và tế bào thu được được sử dụng làm lympho bào máu ngoại vi (PBLs). Các PBL thu được được tạo huyền phù trong RPMI 1640 không có đỏ phenol (được sản xuất bởi Invitrogen Corporation) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (được sản xuất bởi Invitrogen Corporation) (dưới đây được viết tắt là “môi trường ADCC”), và huyền phù tế bào được cho đi qua bộ lọc tế bào (kích thước lỗ: 40 µm, được sản xuất bởi BD Biosciences, Ltd.). Sau đó, các tế bào có thể sống sót được đếm bằng thử nghiệm loại trừ màu chất nhuộm màu xanh trypan. Sau khi huyền phù của các PBLs được ly tâm, môi trường được tách loại, và các tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường ADCC ở mật độ tế bào sống bằng $2,5 \times 10^6$ tế bào/ml và được dùng làm các

tế bào cảm ứng.

Tế bào NCI-H322 được xử lý bằng trypsin, và các tế bào được xử lý được rửa bằng RPMI 1640 chứa 10% FBS và sau đó được tái tạo huyền phù trong RPMI 1640 chứa 10% FBS. Các tế bào (4×10^6 tế bào) được trộn với crom-51 (5550 kBq) được thanh lọc qua thiết bị lọc 0,22 μm , và việc đánh dấu được tiến hành trong 1 giờ dưới các điều kiện 37°C và 5% CO_2 . Các tế bào được đánh dấu được rửa ba lần bằng môi trường ADCC, và các tế bào được tái tạo huyền phù ở 2×10^5 tế bào/ml trong môi trường ADCC và được dùng làm các tế bào đích.

Các tế bào đích ở mật độ tế bào bằng 2×10^5 tế bào/ml được phân tán ở 50 μl /lỗ trong vi đĩa đáy hình chữ U có 96 lỗ. 50 ml mỗi kháng thể cM30 và kháng thể M30 được làm giống người (M30-H1-L4, M30-H4-L4, M30-H1-L5, M30-H1-L6, và M30-H1-L7) được bổ sung vào đó, được pha loãng bằng môi trường ADCC sao cho nồng độ cuối của kháng thể sau khi bổ sung tế bào cảm ứng là 1, 10, 100, hoặc 1000 ng/ml. Sau đó, 100 ml tế bào cảm ứng ở mật độ tế bào bằng $2,5 \times 10^6$ tế bào/ml được bổ sung vào đó, và các tế bào được nuôi cấy trong 4 giờ dưới các điều kiện 37°C và 5% CO_2 . Dịch nổi tế bào được thu gom trong đĩa LumaPlate (được sản xuất bởi PerkinElmer, Inc.), và phóng xạ gama phát ra từ đó được đo sử dụng bộ đếm gama. Phần trăm phân giải tế bào gây ra bởi hoạt tính ADCC được tính theo phương trình sau.

$$\text{Phần trăm phân giải tế bào (\%)} = (A-B) / (C-B) \times 100$$

A: Số đếm phóng xạ từ lỗ chứa mẫu

B: Số đếm sự phát xạ tức thời trung bình (từ lỗ mà kháng thể và tế bào cảm ứng không được bổ sung) ($n=3$). Phương pháp tương tự đối với lỗ mẫu này được tiến hành ngoại trừ rằng môi trường ADCC được bổ sung lượng 50 μl ở thời điểm bổ sung kháng thể và với lượng bằng 100 μl ở thời điểm bổ sung tế bào cảm ứng.

C: Đếm sự phát phóng xạ cực đại trung bình (từ các lỗ mà trong đó các tế bào đích được hòa tan với chất hoạt động bề mặt) ($n=3$). Phương pháp tương tự đối với lỗ mẫu này được tiến hành ngoại trừ rằng 50 ml môi trường ADCC được bổ sung ở thời điểm bổ sung kháng thể và 100 ml môi trường ADCC chứa 2% (v/v) Triton X-100 được bổ sung ở thời điểm bổ sung tế bào cảm ứng.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 4 và Fig.12.

Dữ liệu được thể hiện là giá trị trung bình của các phép đo ba lần, và các thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn. Giá trị P được tính sử dụng thử nghiệm t của Student.

Trong nhóm bổ sung kháng thể M30-H1-L4, hoạt tính ADCC quan sát được theo phương pháp tương tự như trong nhóm bổ sung kháng thể cM30. Ngoài ra, kháng thể M30 được làm giống người khác (M30-H4-L4, M30-H1-L5, M30-H1-L6, và M30-H1-L7) quan sát được có hoạt tính ADCC theo phương pháp tương tự.

Bảng 4

	1 ng/ml		10 ng/ml		100 ng/ml		1000 ng/ml	
	Trung bình (%)	Độ lệch chuẩn	Trung bình (%)	Độ lệch chuẩn	Trung bình (%)	Độ lệch chuẩn	Trung bình (%)	Độ lệch chuẩn
IgG người	3,8	1,6	6,8	1,5	3,9	1,4	6,5	0,5
cM30	11,1	1,2	40,5	2,7	84,3	2,3	88,2	4,0
M30-H1-L4	11,5	1,0	43,1	0,1	83,6	0,7	84,7	1,0
M30-H4-L4	7,6	1,1	26,6	1,6	68,9	2,6	81,7	1,5
M30-H1-L5	9,6	1,1	30,5	2,0	67,8	5,0	78,8	3,0
M30-H1-L6	9,8	1,6	32,0	2,2	74,7	4,0	81,3	2,0
M30-H1-L7	8,3	0,7	29,4	0,7	71,7	2,0	80,7	0,7

12)-3 Tác dụng chống khối u *in vivo* của kháng thể M30 được làm giống người

Các tế bào MDA-MB-231 được tách ra khỏi bình cầu nuôi cấy bằng cách xử lý bằng trypsin, và sau đó được tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS (Life Technologies Corporation), sau đó bằng cách ly tâm và dịch nổi được tách loại. Các tế bào được rửa hai lần bằng môi trường tương tự, và sau đó được tạo huyền phù trong BD Matrigel Basement Membrane Matrix (được sản xuất

bởi BD Biosciences, Inc.). Sau đó, các tế bào được cấy dưới da trong vùng nách của mỗi nhóm chuột nhắt (FOX CHASE SCID C.B, 17/1cr-scid/scidJcl, CLEA Japan, Inc.) ở 6 tuần tuổi ở liều dùng bằng 5×10^6 tế bào/chuột nhắt. Ngày cấy được tính từ ngày 0, và vào ngày 14, 21, 28, 35, và 42, kháng thể M30 được làm giống người (kháng thể M30-H1-L4) được sử dụng trong bụng ở liều dùng bằng 10, 1, 0,1, hoặc 0,01 mg/kg (tương ứng khoảng 200, 20, 2, hoặc 0,2 μ g/chuột nhắt). Thể tích khối u được đo vào ngày 14, 18, 21, 25, 28, 31, 35, 39, 42, 45, và 49, và hiệu quả chống khối u bằng cách sử dụng của kháng thể được đánh giá.

Kết quả là, trong các nhóm sử dụng kháng thể M30 được làm giống người (kháng thể M30-H1-L4) ở 10, 1, và 0,1 mg/kg, sự tăng trưởng khối u được hạn chế một cách đáng kể khi được so sánh với nhóm không được xử lý mà trong đó kháng thể không được sử dụng. Trong các nhóm sử dụng kháng thể M30 được làm giống người (kháng thể M30-H1-L4) ở 10, 1, và 0,1 mg/kg, tỷ lệ ức chế sự tăng trưởng của khối u ($= 100 - (\text{trọng lượng khối u trung bình trong nhóm sử dụng kháng thể}) / (\text{trọng lượng khối u trung bình trong nhóm không được xử lý}) \times 100$) được so sánh với nhóm không được xử lý về trọng lượng khối u vào ngày thứ 49 là 67, 54, và 51%, và các giá trị P đều là $P < 0,0001$. Các giá trị P được tính sử dụng thử nghiệm đa so sánh Dunnett.

Ngoài ra, tỷ lệ ức chế sự tăng trưởng của khối u (%) ($= 100 - (\text{thể tích khối u trung bình ở nhóm sử dụng kháng thể}) / (\text{thể tích khối u trung bình trong nhóm không được xử lý}) \times 100$) của kháng thể M30-H1-L4 vào ngày thứ 49 trong các nhóm sử dụng 10, 1, 0,1, và 0,01 mg/kg lần lượt là 84, 68, 61, và 30%. Theo đó, kháng thể M30 được làm giống người (kháng thể M30-H1-L4) là có hiệu quả chống khối u rất mạnh *in vivo* theo phương pháp tương tự dùng làm kháng thể M30 và kháng thể cM30, và đã khẳng định được rằng tác dụng này được thể hiện trong phương đáp ứng liều (Fig.38).

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế có hoạt tính chống ung thư, và được phẩm chứa kháng thể kháng B7-H3 có thể dùng làm thuốc chống ung thư.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: PCR đoạn môi 1

SEQ ID NO: 2: PCR đoạn môi 2

SEQ ID NO: 3: đoạn môi khởi đầu CMV: đoạn môi 3

SEQ ID NO: 4: đoạn môi đảo BGH: đoạn môi 4

SEQ ID NO: 5: trình tự nucleotit của biến thể 1 của B7-H3

SEQ ID NO: 6: trình tự axit amin của biến thể 1 của B7-H3

SEQ ID NO: 7: Đoạn môi PCR 5

SEQ ID NO: 8: Đoạn môi PCR 6

SEQ ID NO: 9: trình tự nucleotit của biến thể 2 của B7-H3

SEQ ID NO: 10: trình tự axit amin của biến thể 2 của B7-H3

SEQ ID NO: 11: Đoạn môi PCR 7

SEQ ID NO: 12: Đoạn môi PCR 8

SEQ ID NO: 13: Đoạn môi PCR 9

SEQ ID NO: 14: Đoạn môi PCR 10

SEQ ID NO: 15: Đoạn môi PCR 11

SEQ ID NO: 16: Đoạn môi PCR 12

SEQ ID NO: 17: Đoạn môi PCR 13

SEQ ID NO: 18: Đoạn môi PCR 14

SEQ ID NO: 19: Đoạn môi PCR 15

SEQ ID NO: 20: trình tự nucleotit của B7-H3 IgV1

SEQ ID NO: 21: trình tự axit amin của B7-H3 IgV1

SEQ ID NO: 22: trình tự nucleotit của B7-H3 IgC1

SEQ ID NO: 23: trình tự axit amin của B7-H3 IgC1

SEQ ID NO: 24: trình tự nucleotit của B7-H3 IgV2

SEQ ID NO: 25: trình tự axit amin của B7-H3 IgV2

SEQ ID NO: 26: trình tự nucleotit của B7-H3 IgC2

SEQ ID NO: 27: trình tự axit amin của B7-H3 IgC2

SEQ ID NO: 28: trình tự nucleotit của B7-H3 IgC1-V2-C2

SEQ ID NO: 29: trình tự axit amin của B7-H3 IgC1-V2-C2

SEQ ID NO: 30: trình tự nucleotit của B7-H3 IgV2-C2

SEQ ID NO: 31: trình tự axit amin của B7-H3 IgV2-C2

SEQ ID NO: 32: trình tự nucleotit của B7RP-1

SEQ ID NO: 33: trình tự axit amin của B7RP-1

SEQ ID NO: 34: trình tự nucleotit của B7-H1

SEQ ID NO: 35: trình tự axit amin của B7-H1

SEQ ID NO: 36: trình tự nucleotit của B7-DC

SEQ ID NO: 37: trình tự axit amin của B7-DC

SEQ ID NO: 38: trình tự nucleotit của CD80

SEQ ID NO: 39: trình tự axit amin của CD80

SEQ ID NO: 40: trình tự nucleotit của CD86

SEQ ID NO: 41: trình tự axit amin của CD86

SEQ ID NO: 42: trình tự nucleotit của B7-H4

SEQ ID NO: 43: trình tự axit amin của B7-H4

SEQ ID NO: 44: Trình tự axit amin đầu N của chuỗi nặng của kháng thể M30 ở chuột nhắt

SEQ ID NO: 45: Trình tự axit amin đầu N của chuỗi nhẹ của kháng thể M30 ở chuột nhắt

SEQ ID NO: 46: Đoạn mồi PCR 16

SEQ ID NO: 47: Đoạn môi PCR 17

SEQ ID NO: 48: Đoạn môi PCR 18

SEQ ID NO: 49: Đoạn môi PCR 19

SEQ ID NO: 50: trình tự nucleotit của cADN mã hóa chuỗi nặng của kháng thể M30

SEQ ID NO: 51: trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể M30

SEQ ID NO: 52: trình tự nucleotit của cADN mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể M30

SEQ ID NO: 53: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể M30

SEQ ID NO: 54: Đoạn môi PCR 20

SEQ ID NO: 55: Đoạn môi PCR 21

SEQ ID NO: 56: trình tự ADN mã hóa tín hiệu gây tiết chuỗi κ ở người, vùng hằng định chuỗi κ , và tín hiệu bổ sung poly-A ở người

SEQ ID NO: 57: đoạn ADN bao gồm trình tự ADN mã hóa axit amin của trình tự tín hiệu và vùng hằng định của IgG1 người

SEQ ID NO: 58: trình tự nucleotit của cADN mã hóa chuỗi nhẹ loại kháng thể khảm của M30

SEQ ID NO: 59: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại kháng thể khảm của M30

SEQ ID NO: 60: Đoạn môi PCR 22

SEQ ID NO: 61: Đoạn môi PCR 23

SEQ ID NO: 62: trình tự nucleotit của cADN mã hóa chuỗi nặng loại thể khảm của kháng thể M30

SEQ ID NO: 63: trình tự axit amin của chuỗi nặng loại thể khảm của kháng thể M30

SEQ ID NO: 64: Đoạn môi PCR 24

SEQ ID NO: 65: Đoạn môi PCR 25

SEQ ID NO: 66: Đoạn môi PCR 26

SEQ ID NO: 67: Đoạn mồi PCR 27

SEQ ID NO: 68: Đoạn mồi PCR 28

SEQ ID NO: 69: Đoạn mồi PCR 29

SEQ ID NO: 70: trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L1

SEQ ID NO: 71: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L1

SEQ ID NO: 72: trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L2

SEQ ID NO: 73: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L2

SEQ ID NO: 74: trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L3

SEQ ID NO: 75: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L3

SEQ ID NO: 76: trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L4

SEQ ID NO: 77: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L4

SEQ ID NO: 78: trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L5

SEQ ID NO: 79: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L5

SEQ ID NO: 80: trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L6

SEQ ID NO: 81: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L6

SEQ ID NO: 82: trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L7

SEQ ID NO: 83: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L7

SEQ ID NO: 84: trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-H1

SEQ ID NO: 85: trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-H1

SEQ ID NO: 86: trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H2

SEQ ID NO: 87: trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H2

SEQ ID NO: 88: trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H3

SEQ ID NO: 89: trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H3

SEQ ID NO: 90: trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H4

SEQ ID NO: 91: trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H4

SEQ ID NO: 92: trình tự axit amin của kháng thể M30 CDRH1

SEQ ID NO: 93: trình tự axit amin của kháng thể M30 CDRH2

SEQ ID NO: 94: trình tự axit amin của kháng thể M30 CDRH3

SEQ ID NO: 95: trình tự axit amin của kháng thể M30 CDRL1

SEQ ID NO: 96: trình tự axit amin của kháng thể M30 CDRL2

SEQ ID NO: 97: trình tự axit amin của kháng thể M30 CDRL3

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó khác biệt ở chỗ có các tính chất sau:

(a) liên kết đặc hiệu với B7-H3; trong đó B7-H3 là phân tử bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc 10, và kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể liên kết với polypeptit chứa IgC2, trong đó IgC2 là vùng B7-H3;

(b) có hoạt tính thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP);

(c) có hoạt tính chống khối u *in vivo*, và

(d) có hoạt tính ức chế cạnh tranh kháng thể M30 đối với quá trình liên kết với B7-H3, trong đó kháng thể M30 chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin 20 đến 471 của SEQ ID NO: 51 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc 23 đến 235 của SEQ ID NO: 53.

2. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này theo điểm 1, mà liên kết với IgC1 và IgC2 mỗi loại trong số chúng là vùng B7-H3.

3. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó IgC2 là vùng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 358 đến 456 trong SEQ ID NO: 6.

4. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm 2, trong đó IgC1 là vùng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 140 đến 244 trong SEQ ID NO: 6.

5. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, mà có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

6. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể bao gồm CDRH1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 93, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94 dùng làm các vùng xác định hỗ trợ của chuỗi nặng và bao gồm CDRL1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 95, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 96, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 97 dùng làm các vùng xác định hỗ trợ của chuỗi nhẹ.

7. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 23 đến 130 trong SEQ ID NO: 53.

8. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó vùng hằng định là vùng hằng định có nguồn gốc từ người.

9. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59.

10. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, mà được làm giống người.

11. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm 10, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (a) trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85, (b) trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 87, (c) trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 89, (d) trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91, (e) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự bất kỳ trong các trình tự (a) đến (d), và (f) trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin bị mất, thay thế hoặc bổ sung trong trình tự bất kỳ từ (a) đến (d); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (g) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 71, (h) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 73, (i) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 75, (j) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 77, (k) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 79, (l) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 81, (m) trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 83, (n) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95% hoặc lớn hơn với trình tự bất kỳ từ (g) đến (m), và (o) trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin bị mất, thay thế hoặc bổ sung trong trình tự bất kỳ từ (g) đến (m).

12. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm 11, trong đó kháng thể

hoặc mảnh chức năng của kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 71; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 73; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 75; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 77; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 79; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 81; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 83; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 71; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 73; vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 75; và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 77.

13. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm 11 hoặc 12, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 71; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit

amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 73; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 75; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 77; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 79; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 81; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 83; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 71; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 73; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 75; và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có số axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 77.

14. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 75; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 79; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 81; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

85 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 83; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73; chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 75; và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77.

15. Mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó mảnh chức năng được chọn từ nhóm bao gồm Fab, F(ab)₂, Fab' và Fv.

16. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể bao gồm chuỗi nặng thứ nhất và thứ hai, trong đó chuỗi nặng thứ nhất và thứ hai độc lập được chọn từ (i) đến (iii) dưới đây:

(i) chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ;

(ii) chuỗi nặng trong đó 1 axit amin bị mất ở đầu cacboxyl của chuỗi nặng, hoặc

(iii) chuỗi nặng trong đó 2 axit amin bị mất ở đầu cacboxyl của chuỗi nặng,

tốt hơn nếu trong đó chuỗi nặng thứ nhất và thứ hai mỗi loại được chọn từ mục (ii).

17. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm 16, trong đó chuỗi nặng thứ nhất và thứ hai mỗi loại độc lập được chọn từ các mục (ii) hoặc (iii), và trong đó gốc axit amin nằm ở đầu cacboxyl của chuỗi nặng được amit hóa, tốt hơn nếu trong đó gốc axit amin là gốc prolin.

18. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể là biến thể được biến đổi bao gồm biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm: liên kết của gốc hóa học với gốc axit amin, chuỗi cacbohydrat liên kết với N hoặc liên kết với O, glycosyl hóa liên kết với N hoặc liên kết với O, xử lý đầu N hoặc đầu C, khử amit, đồng phân hóa gốc axit aspartic, oxy hóa gốc methionin, và bổ sung gốc methionin vào đầu N.

19. Kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó biến đổi của glycan được điều hòa để tăng cường hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể.

20. Polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

21. Polynucleotit theo điểm 20, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 50 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 67 đến 390 trong SEQ ID NO: 52.

22. Polynucleotit theo điểm 20 hoặc 21, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58.

23. Polynucleotit theo điểm 20 hoặc 21, trong đó polynucleotit bao gồm: trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84, (b) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 86, (c) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 88, (d) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90, và (e) trình tự nucleotit bao gồm polynucleotit mà lai với polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với trình tự bất kỳ từ (a) đến (d) dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (f) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 70, (g) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 72, (h) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 74, (i) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 76, (j) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 78, (k) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 80, (l) trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 82, và (m) trình tự nucleotit bao gồm polynucleotit mà lai với polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ với trình tự bất kỳ từ (f) đến (l) dưới các điều kiện nghiêm ngặt.

24. Polynucleotit theo điểm 23, trong đó polynucleotit bao gồm các trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm: trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 74; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 76; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 78; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự

nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 80; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 82; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 74; và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 423 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 384 trong SEQ ID NO: 76.

25. Polynucleotit theo điểm 23 hoặc 24, trong đó polynucleotit bao gồm các trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm: trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 74; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 76; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 78; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 80; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 82; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 74; và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 58 đến 1413 trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit có số nucleotit từ 61 đến 699 trong SEQ ID NO: 76.

26. Polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 25, trong đó polynucleotit bao gồm các trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm: trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID

NO: 72; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 74; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 76; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 78; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 80; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 84 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 82; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 72; trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 74; và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 90 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 76.

27. Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 26.

28. Tế bào chủ, mà được biến nạp với vector biểu hiện theo điểm 27.

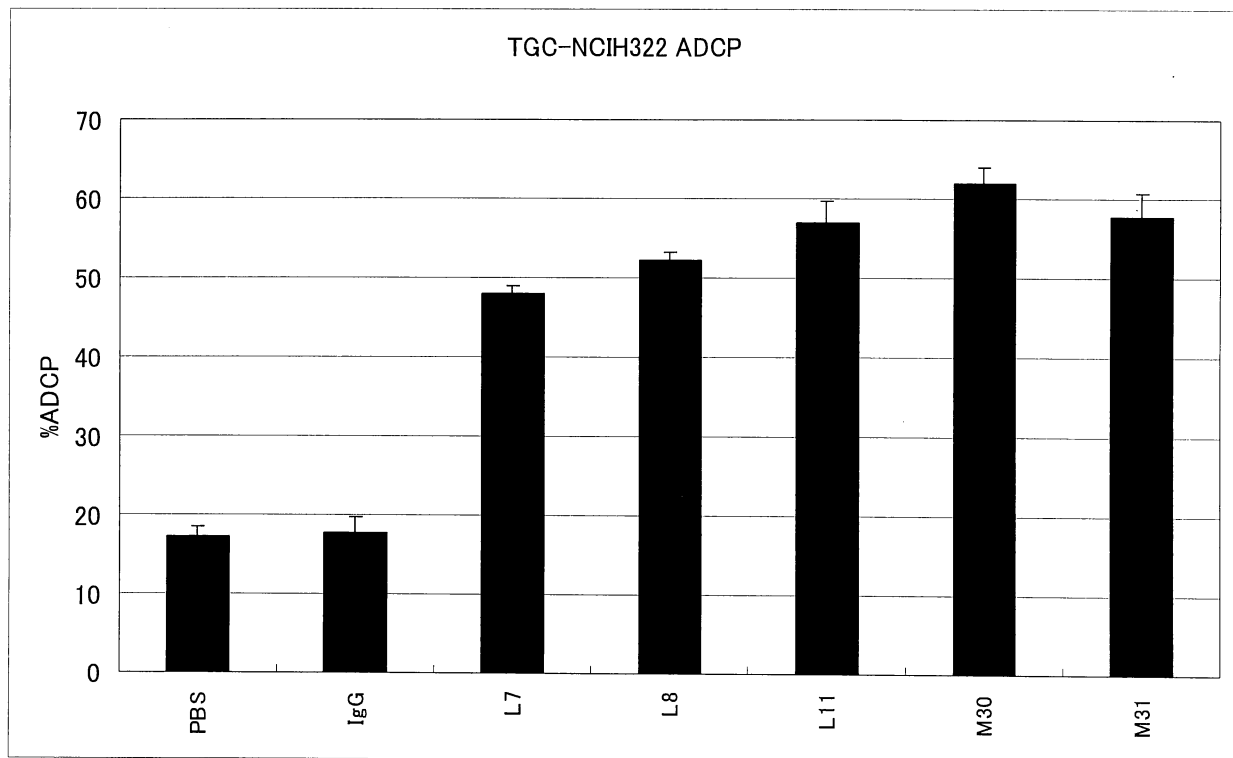
29. Tế bào chủ theo điểm 28, trong đó tế bào chủ là tế bào có nhân điển hình.

30. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh chức năng của kháng thể này, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 28 hoặc 29 và bước thu gom kháng thể mong muốn hoặc mảnh chức năng của kháng thể này từ sản phẩm nuôi cấy thu được trong bước nuôi cấy này.

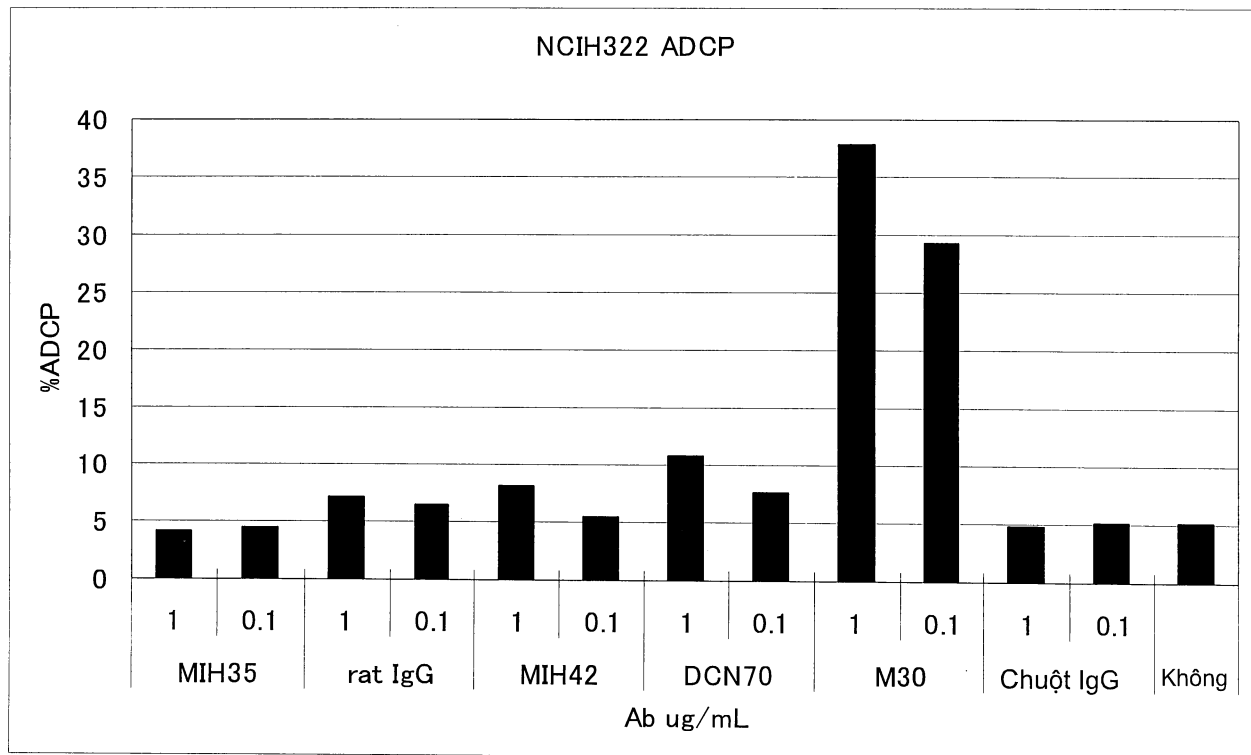
31. Dược phẩm khác biệt ở chỗ, chứa ít nhất một trong các kháng thể hoặc các mảnh chức năng của các kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19.

32. Dược phẩm để điều trị khối u, khác biệt ở chỗ, bao gồm ít nhất một trong các kháng thể hoặc các mảnh chức năng của các kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19 và ít nhất một tác nhân điều trị ung thư.

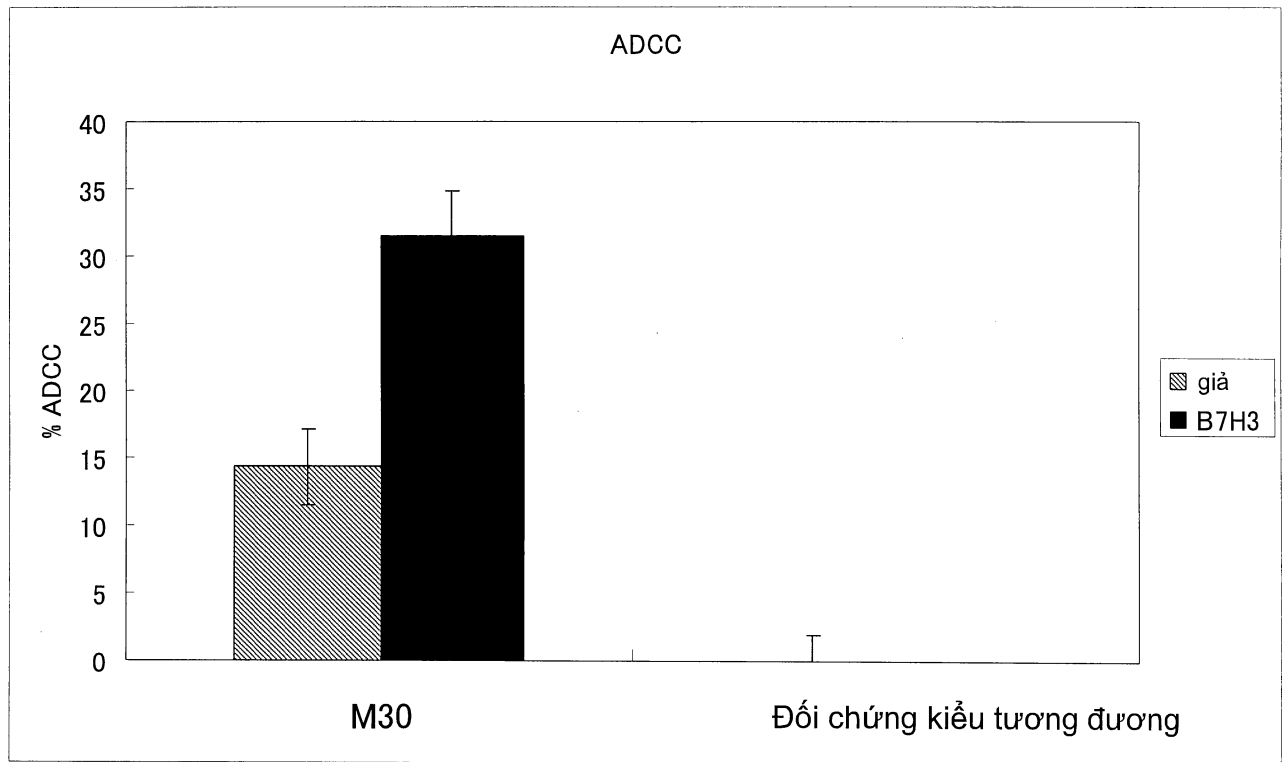
[Fig. 1]



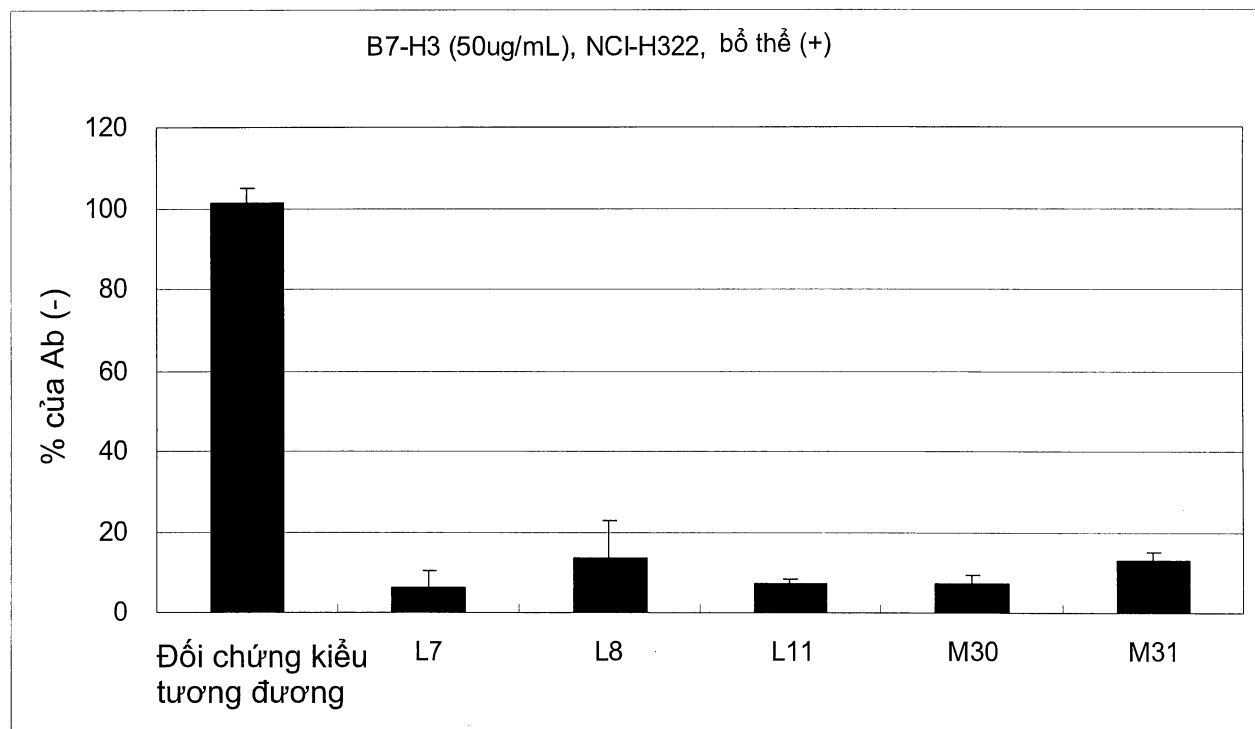
[Fig. 2]



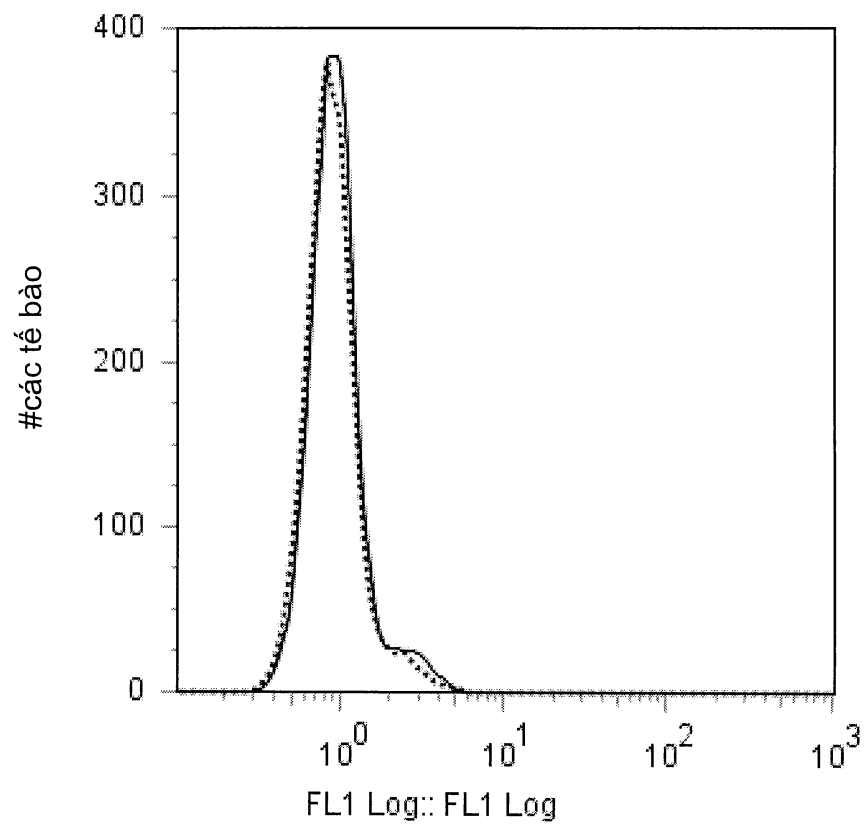
[Fig. 3]



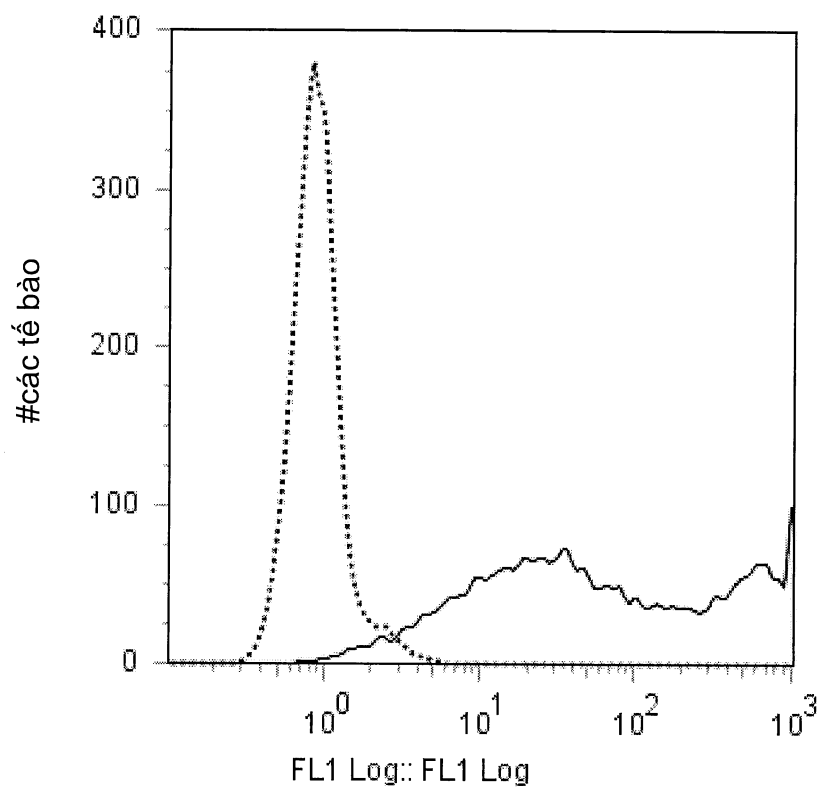
[Fig. 4]



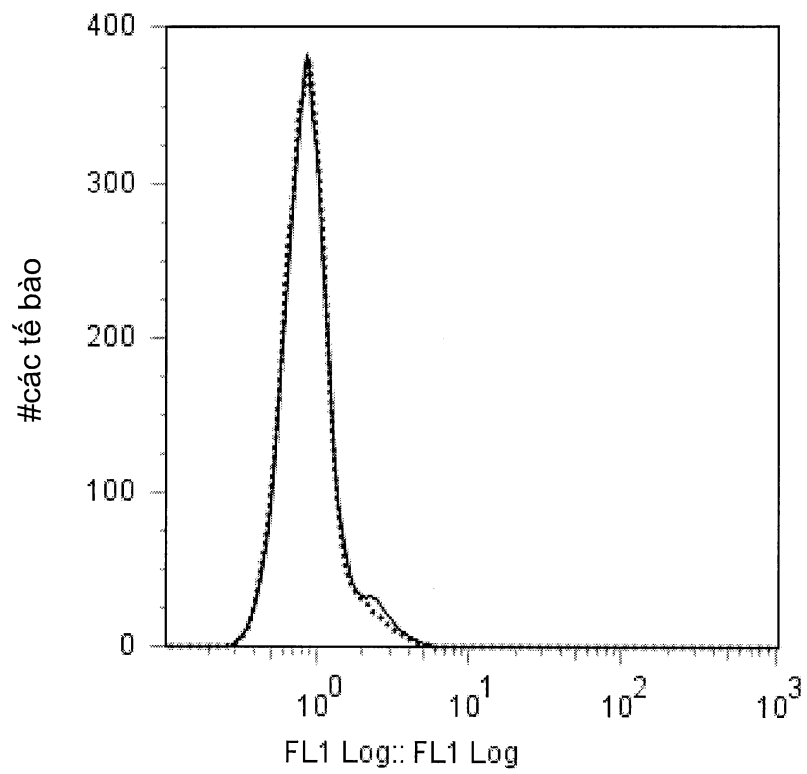
[Fig. 5-1] B7-H3 IgV1



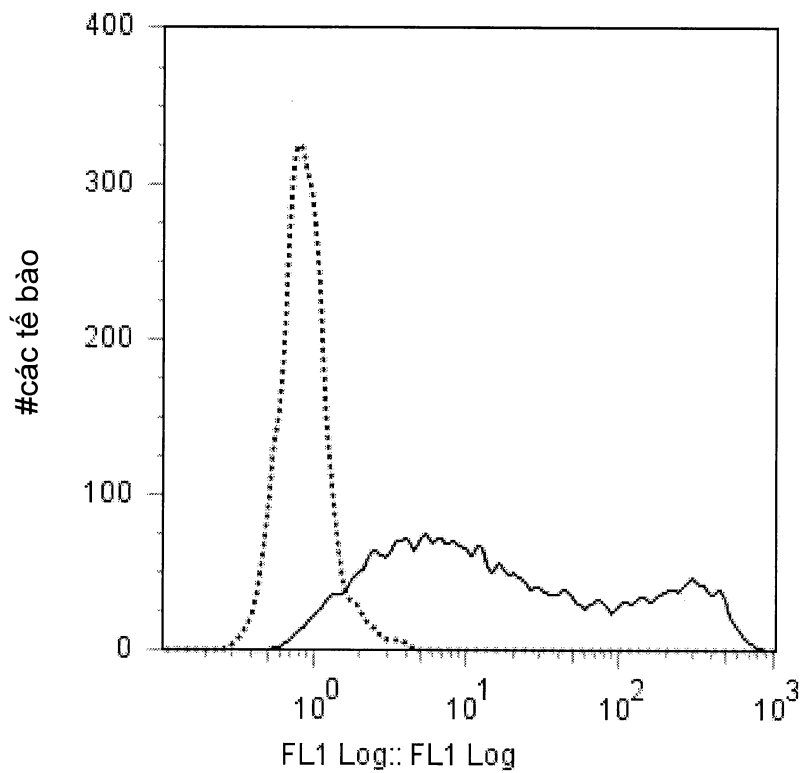
[Fig. 5-2] B7-H3 IgC1



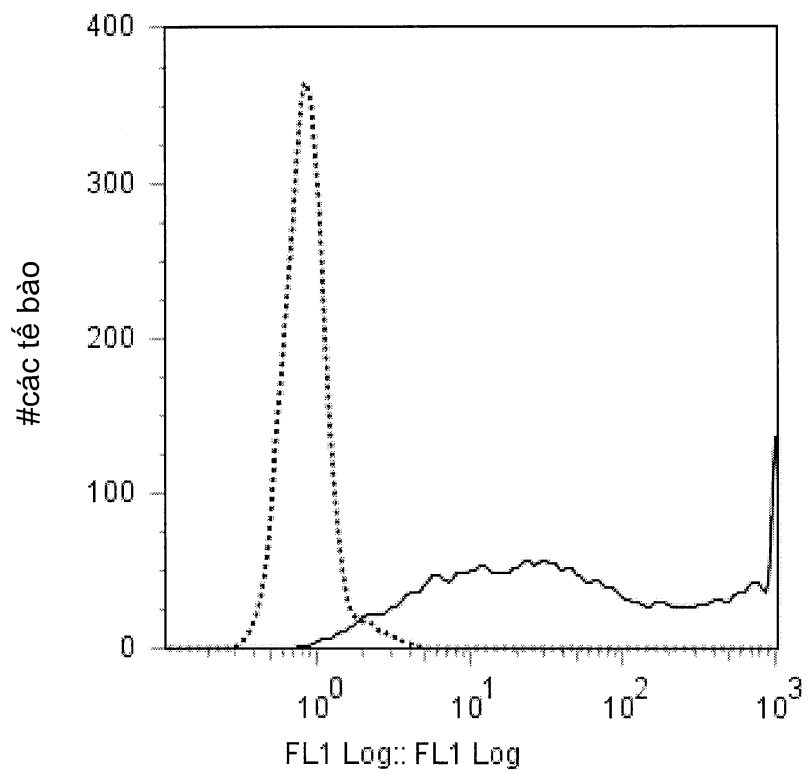
[Fig. 5-3] B7-H3 IgV2



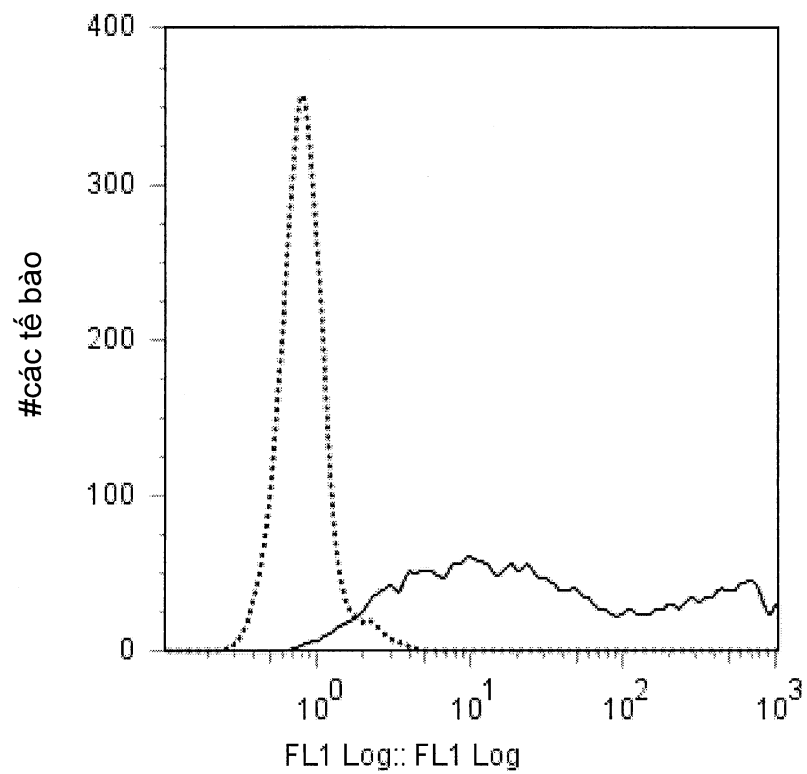
[Fig. 5-4] B7-H3 IgC2



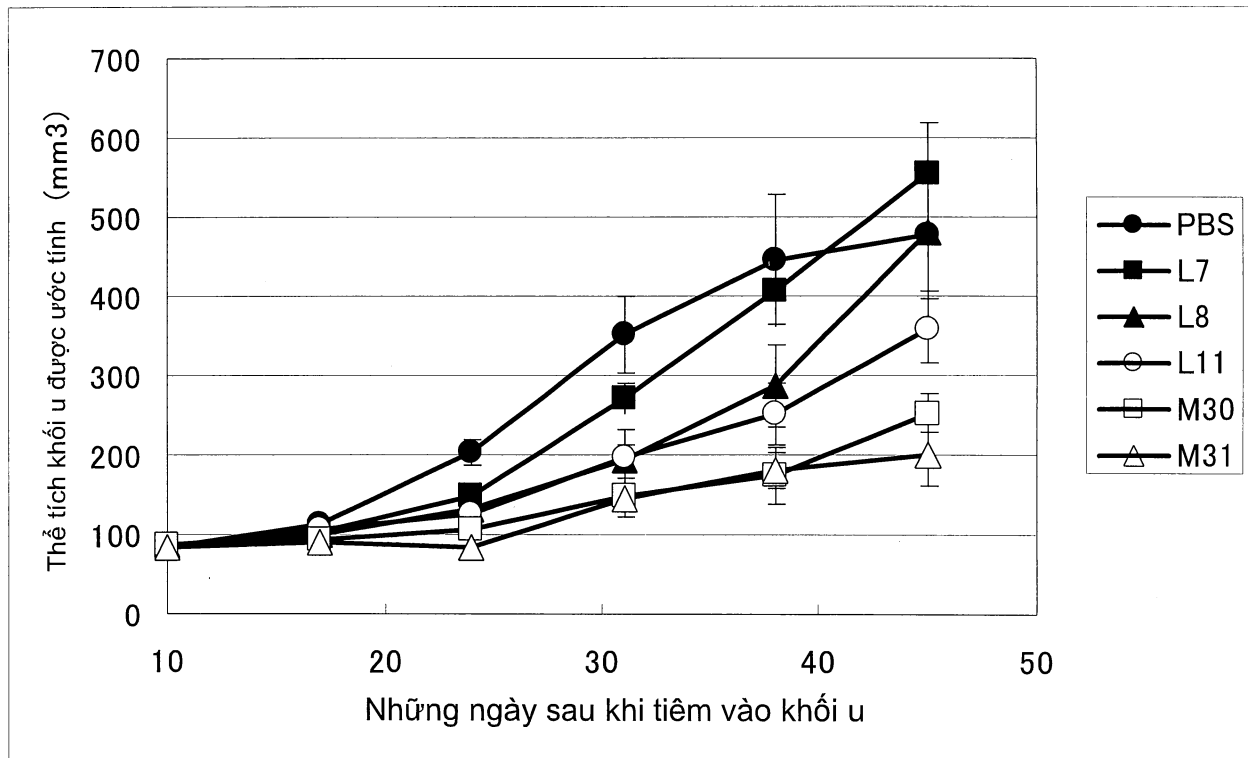
[Fig. 5-5] B7-H3 IgC1-V2-C2



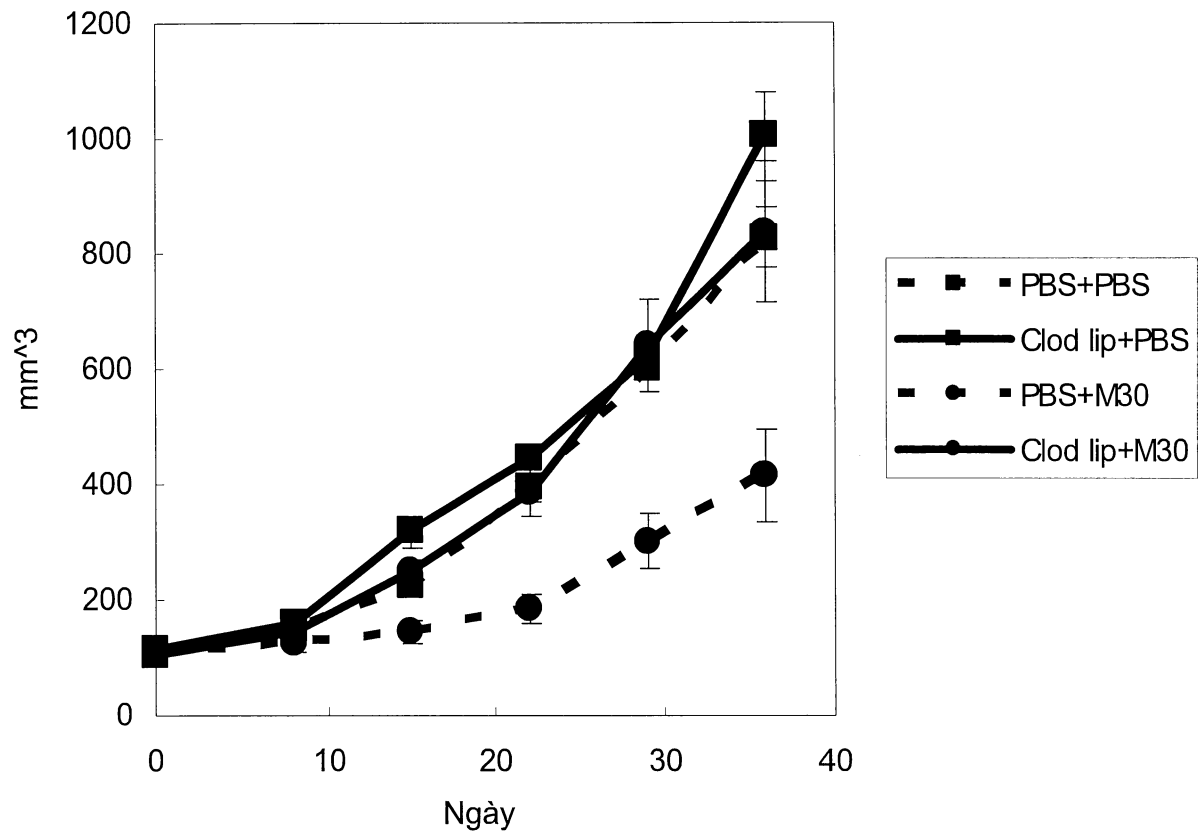
[Fig. 5-6] B7-H3 IgV2-C2



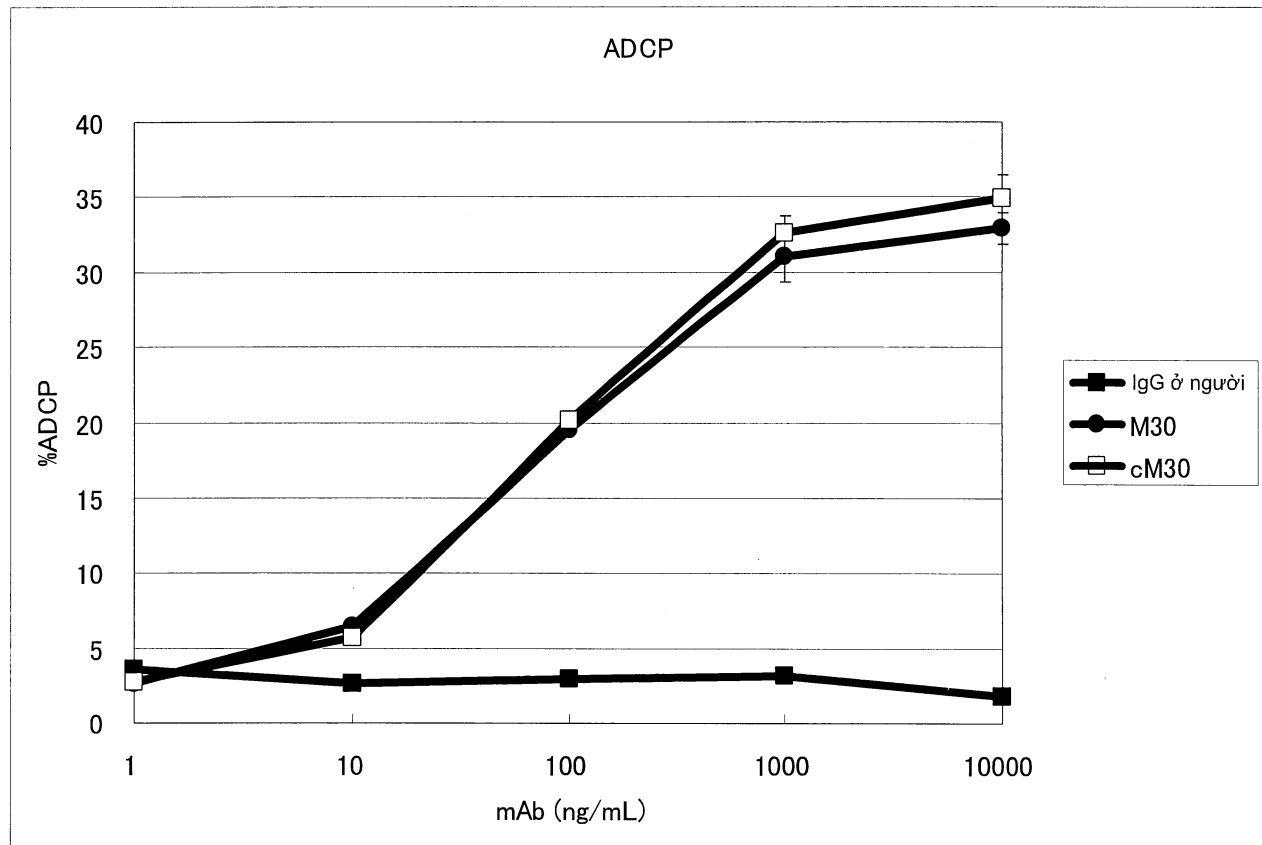
[Fig. 6]



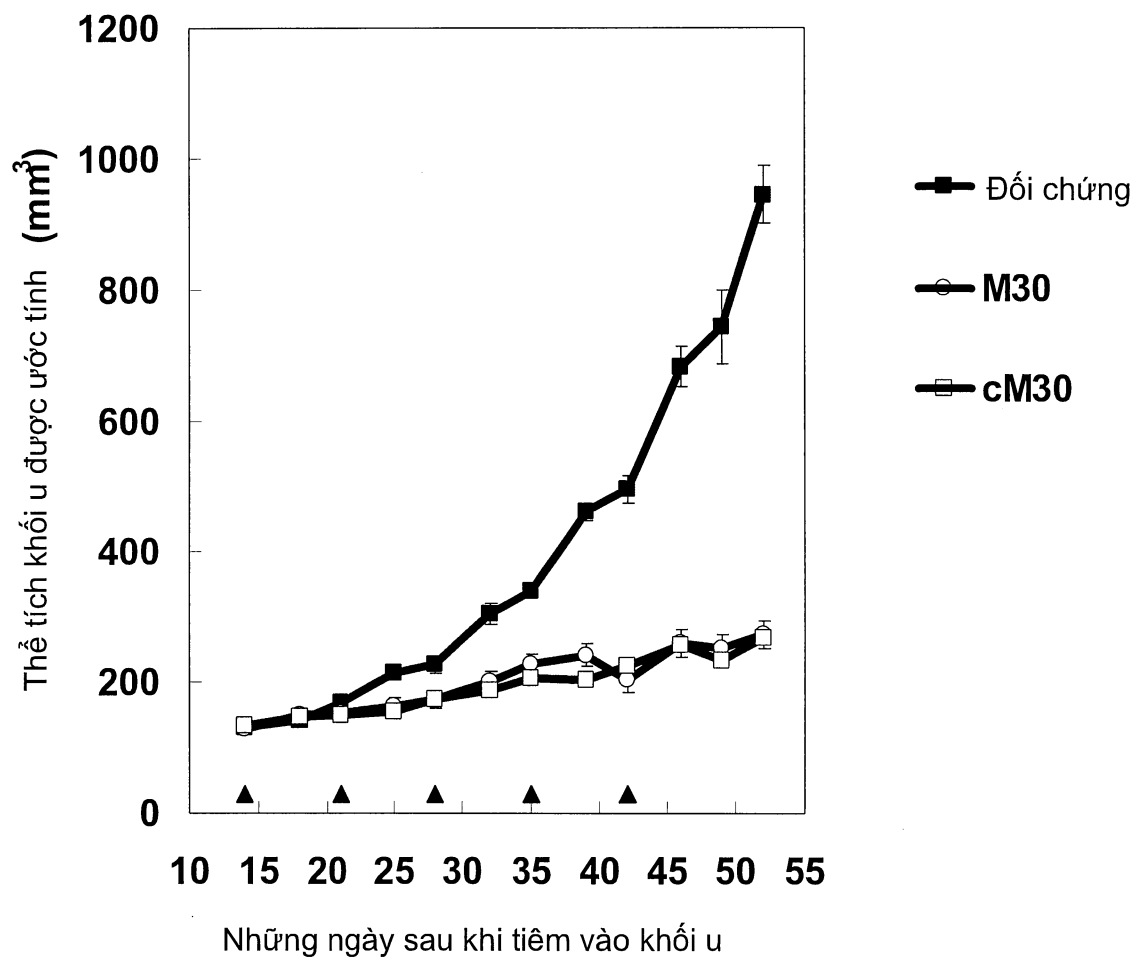
[Fig. 7]



[Fig. 8]

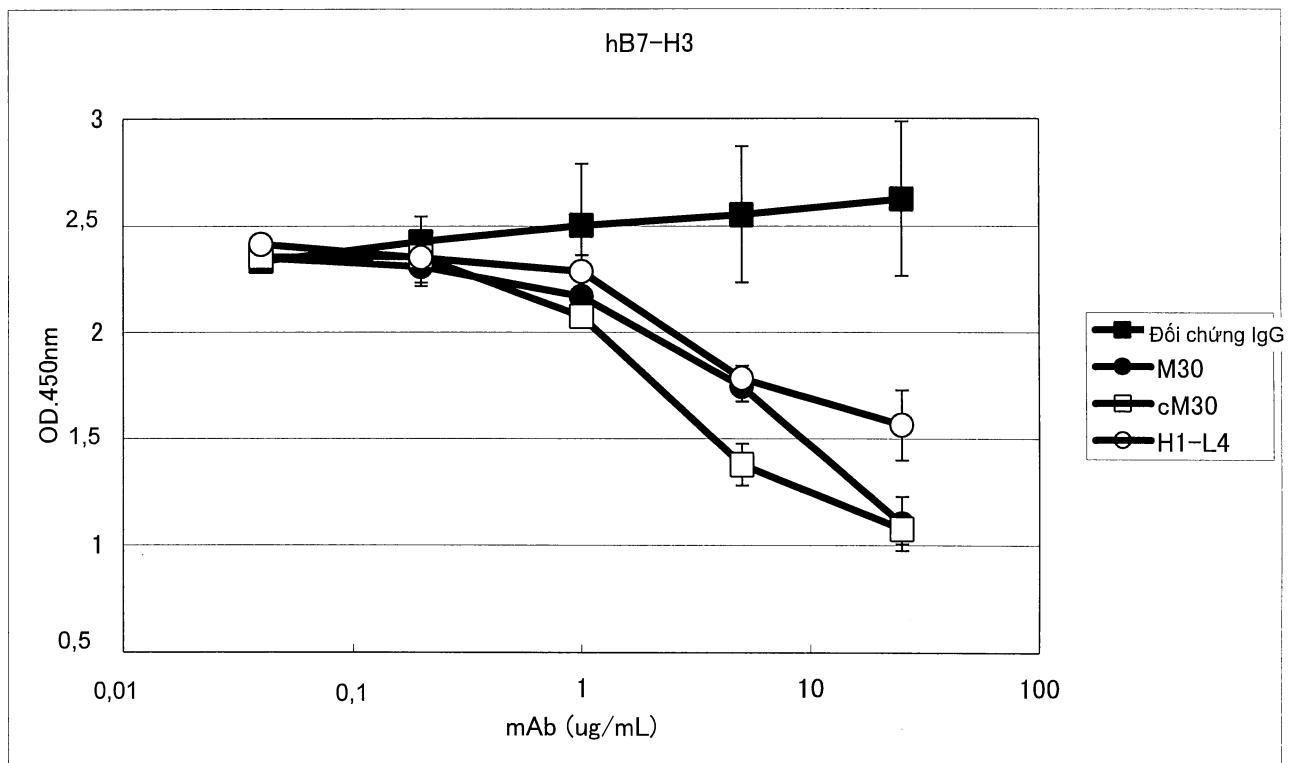


[Fig. 9]



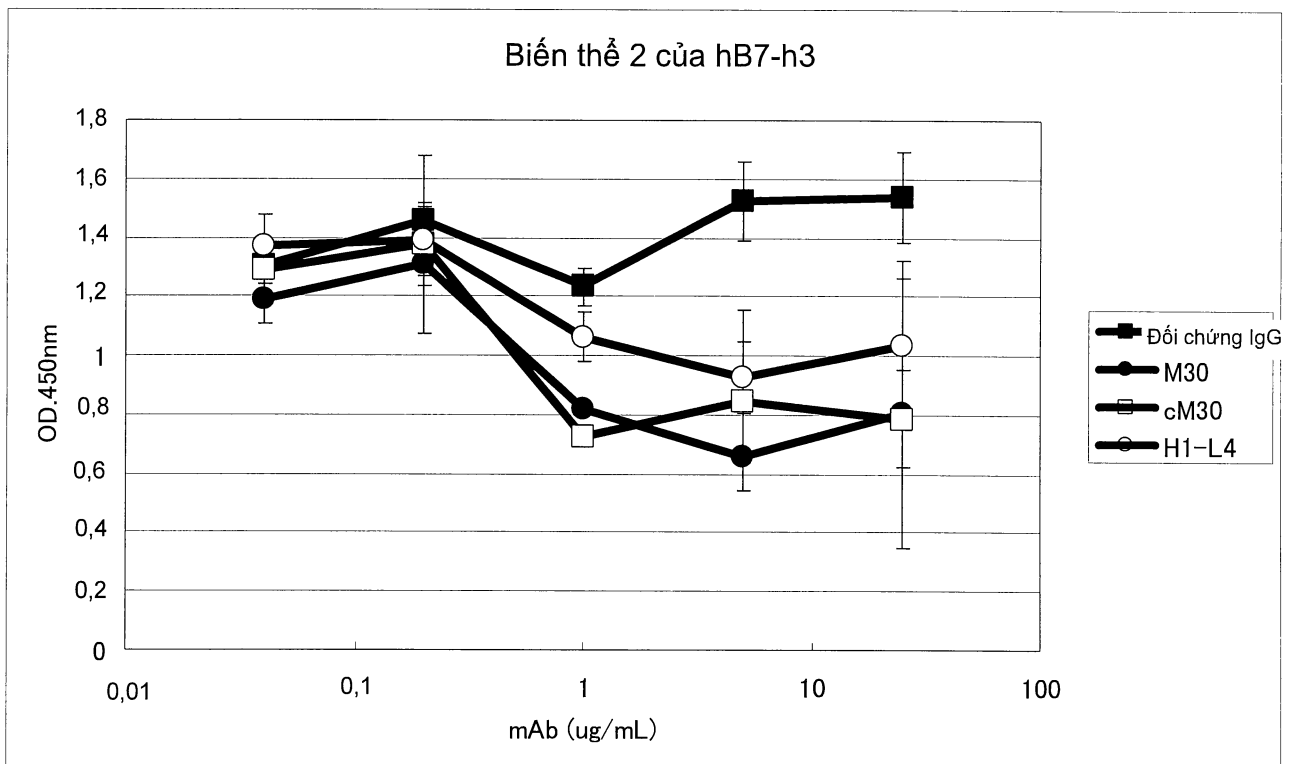
[Fig. 10-1]

Biến thể 1 của B7-H3

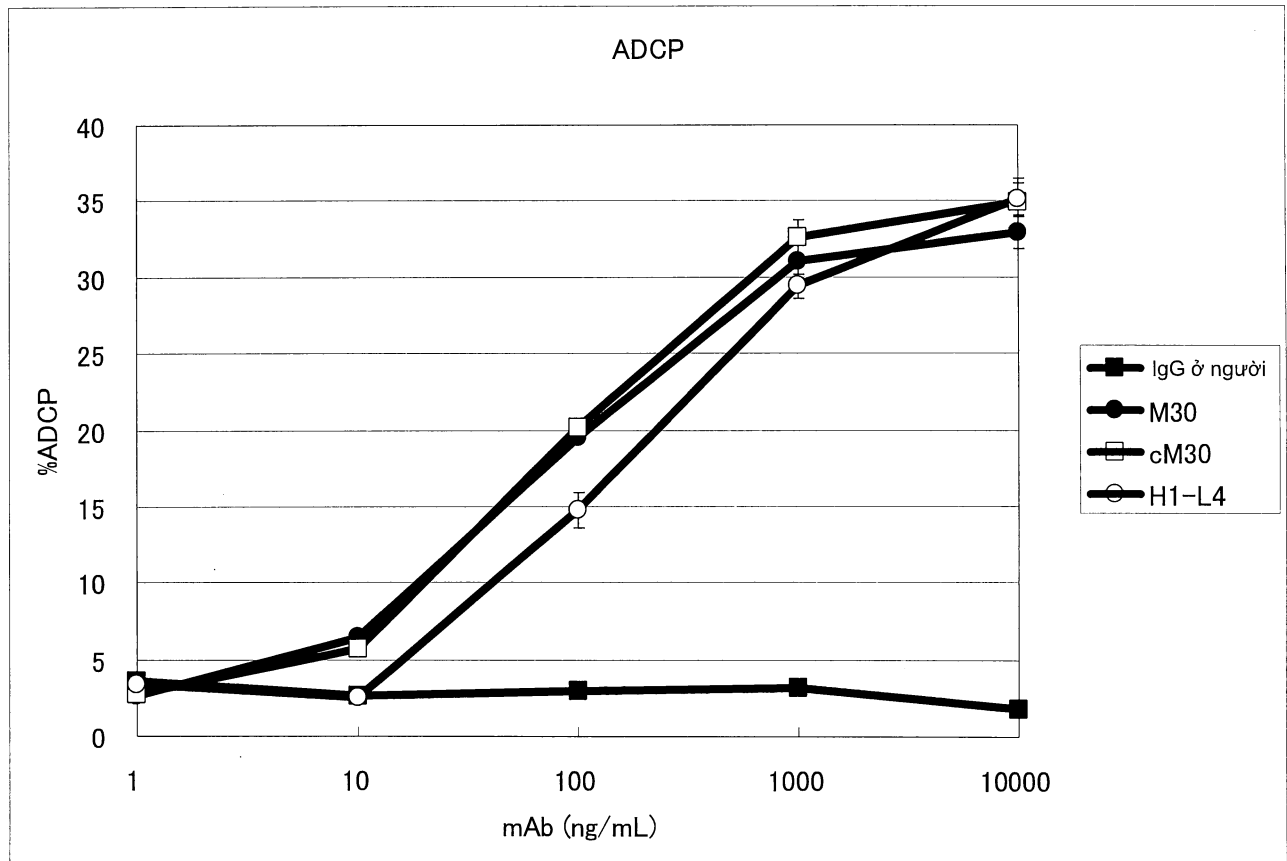


[Fig. 10-2]

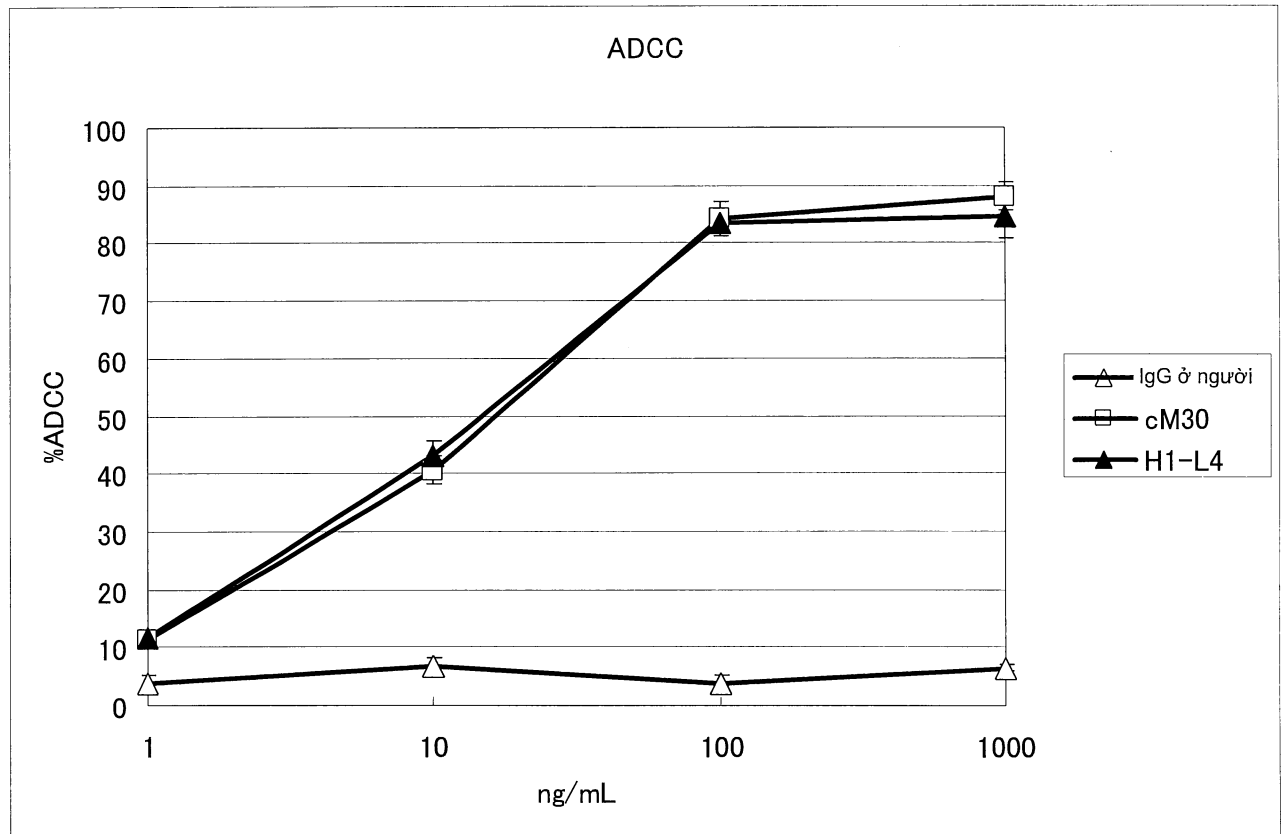
Biến thể 2 của B7-H3



[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13-1]

Trình tự nucleotit của biến thể 1 của B7-H3 (SEQ ID NO: 5)

atgctgctgcgtcggcggggcagccctggcatgggtgtgcatgtgggtgcagccctgggagcactgtgg
 ttctgcctcacaggagccctggaggtccaggtccctgaagacccagtgggtggcactgggtgggcacc
 gatgccaccctgtgctgctccttctcccttgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctcatc
 tggcagctgacagataccaaacagctgggtgcacagctttgctgagggccaggaccagggcagcgcc
 tatgccaaaccgcacggccctcttcccgacctgctggcacagggcaacgcatccctgaggctgcag
 cgctgtgcgtgtggcggacgagggcagcttcacctgcttcgtgagcatccgggatttcggcagcgct
 gccgtcagcctgcaggtggccgctccctactcgaagcccagcatgacctggagcccaacaaggac
 ctgcggccaggggacacgggtgaccatcacgtgctccagctaccagggctaccctgaggctgaggtg
 ttctggcaggatgggcaggggtgtgccctgactggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgag
 cagggcttggttgatgtgcacagcatcctgcgggtgggtgctgggtgcaaattggcacctacagctgc
 ctgggtgcgcaaccccgctgctgcagcaggatgcgcacagctctgtcaccatcacaccccagagaagc
 cccacaggagccgtggaggtccaggtccctgaggacccgggtgggtggccctagtgggcaccgatgcc
 acctgcgctgctccttctccccgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctcatctggcag
 ctgacagacaccaaacagctgggtgcacagtttcaccgaaggccgggaccagggcagcgccatgcc
 aaccgcacggccctcttcccgacctgctggcacaaggcaatgcatccctgaggctgcagcgctg
 cgtgtggcggacgagggcagcttcacctgcttcgtgagcatccgggatttcggcagcgctgccgtc
 agcctgcaggtggccgctccctactcgaagcccagcatgacctggagcccaacaaggacctgcgg
 ccaggggacacgggtgaccatcacgtgctccagctaccggggctaccctgaggctgaggtgttctgg
 caggatgggcaggggtgtgccctgactggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgagcagggc
 ttgtttgatgtgcacagcgtcctgcgggtgggtgctgggtgcgaatggcacctacagctgcctgggtg
 cgcaaccccgctgctgcagcaggatgcgcacggctctgtcaccatcacagggcagcctatgacattc
 cccccagaggccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcactgctgggtggccctg
 gctttcgtgtgctggagaaagatcaaacagagctgtgaggaggagaatgcaggagctgaggaccag
 gatggggaggggagaaggctccaagacagccctgcagcctctgaaacactctgacagcaaagaagat
 gatggacaagaaatagcctgagcggccgcccactgtgctggatatctgcagaattccaccacactgg
 actagtggatccgagctcggtaccaagcttaagtttaaacgctgatcagcctcgactgtgccttc
 tagttgccagccatctgtttgtttgccctcccccgctgccttccttgacctggaagggtgccactcc
 cactgtcctttcctaataaaaatgaggaaaattgc

[Fig. 13-2]

Trình tự axit amin của biến thể 1 của B7-H3 (SEQ ID NO: 6)

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPFPGFSLAQLNLI
 WQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVVADEGSFTCFVSIRDFGSA

24713

AVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNTTTSQMANE
QGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDA
TLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQRV
RVADEGSFTCFVSIRDGSAASLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFW
QDGQGVPLTGNTTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTF
PPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSDSKED
DGQEIA

[Fig. 14-1]

Trình tự nucleotit của biến thể 2 của B7-H3 (SEQ ID NO: 9)

atgctgcgtcggcggggcagccctggcatgggtgtgcatgtgggtgcagccctgggagcactgtgg
 ttctgcctcacaggagccctggaggtccaggtccctgaagacccagtggtggcactggtgggcacc
 gatgccaccctgtgctgctccttctccctgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctcatc
 tggcagctgacagatacctaaacagctgggtgcacagctttgctgagggccaggaccagggcagcgcc
 tatgccaaaccgcacggccctcttcccgacctgctggcacagggcaacgcatccctgaggctgcag
 cgctgcgtgtggcgagcaggggcagcttcacctgcttcgtgagcatccgggatttcggcagcgct
 gccgtcagcctgcaggtggccgctccctactcgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggac
 ctgcggccaggggacacgggtgaccatcacgtgctccagctaccggggctaccctgaggctgaggtg
 ttctggcaggatgggcaggggtgtgcccctgactggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgag
 cagggcttggttgatgtgcacagcgtcctgcgggtggtgctgggtgcgaatggcacctacagctgc
 ctggtgcgcaaccccgctgctgcagcaggatgcgcacggctctgtcaccatcacagggcagcctatg
 acattccccccagaggccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcactgctggtg
 gccctggcttttcgtgtgctggagaaagatcaaacagagctgtgaggaggagaatgcaggagctgag
 gaccaggatggggagggagaaggctccaagacagccctgcagcctctgaaacactctgacagcaaa
 gaagatgatggacaagaaatagcc

[Fig. 14-2]

Trình tự axit amin của biến thể 2 của B7-H3 (SEQ ID NO: 10)

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGFSLAQLNLI
 WQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSA
 AVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYRGYPEAEVFWQDQGQGVPLTGNTTSQMANE
 QGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLV
 ALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[Fig. 15-1]

Trình tự nucleotit của B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 20)

GGAGCCCTGGAGGTCCAGGTCCCTGAAGACCCAGTGGTGGCACTGGTGGGCACCGATGCCACCCTG
TGCTGCTCCTTCTCCCCTGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACA
GATACCAAACAGCTGGTGCACAGCTTTGCTGAGGGCCAGGACCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGC
ACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAGGGCAACGCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCGTGTG
GCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTTCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTG
CAGGTGGCCGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTC
TGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAG
GAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCT
CTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 15-2]

Trình tự axit amin của B7-H3 IgV1 (SEQ ID NO: 21)

GALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANR
TALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAGQPMTFPPEALWVTVGLSV
CLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[Fig. 16-1]

Trình tự nucleotit của B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 22)

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTG
 ACCATCACGTGCTCCAGCTACCAGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGT
 GTGCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCAC
 AGCATCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCAAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTG
 CAGCAGGATGCGCACAGCTCTGTCACCATCACACCCCAGAGAAGCCCCACAGGGCAGCCTATGACA
 TTTTTCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCC
 CTGGCTTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGAC
 CAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAA
 GATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 16-2]

Trình tự axit amin của B7-H3 IgC1 (SEQ ID NO: 23)

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVH
 SILRVVLGANGTYSCLVARNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVA
 LAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[Fig. 17-1]

Trình tự nucleotit của B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 24)

GGAGCCGTGGAGGTCCAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCACCCTG
CGCTGCTCCTTCTCCCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACA
GACACCAAACAGCTGGTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGC
ACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCGTGTG
GCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTTCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTG
CAGGTGGCCGGGCAGCCTATGACATTCACCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTC
TGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAG
GAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCT
CTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 17-2]

Trình tự axit amin của B7-H3 IgV2 (SEQ ID NO: 25)

GAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANR
TALFPDLLAQGNASLRLQVRVADSGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAGQPMTFPPEALWVTVGLSV
CLIALLLVALAFVCWRRIKQSC EEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[Fig. 18-1]

Trình tự nucleotit của B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 26)

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTG
 ACCATCACGTGCTCCAGCTACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGT
 GTGCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCAC
 AGCGTCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTG
 CAGCAGGATGCGCACGGCTCTGTACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTG
 TGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTCGTGTGCTGG
 AGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAA
 GGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATA
 GCCTGA

[Fig. 18-2]

Trình tự axit amin của B7-H3 IgC2 (SEQ ID NO: 27)

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNTTTSQMANEQGLFDVH
 SVLRVVLGANGTYSCLVARNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCW
 RKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[Fig. 19-1]

Trình tự nucleotit của B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 28)

GCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTG
 ACCATCACGTGCTCCAGCTACCAGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGT
 GTGCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCAC
 AGCATCCTGCGGGTGGTGCTGGGTGCAAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTG
 CAGCAGGATGCGCACAGCTCTGTACCATCACACCCAGAGAAGCCCCACAGGAGCCGTGGAGGTC
 CAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCACCCTGCGCTGCTCCTTCTCC
 CCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACAGACACCAAACAGCTG
 GTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGCACGGCCCTCTTCCCG
 GACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCGTGTGGCGGACGAGGGCAGC
 TTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTTCGGCAGCGCTGCCGTGAGCCTGCAGGTGGCCGCTCCC
 TACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTGACCATC
 ACGTGCTCCAGCTACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGTGTGCCC
 CTGACTGGCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCACAGCGTC
 CTGCGGGTGGTGCTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTGCAGCAG
 GATGCGCACGGCTCTGTACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTG
 ACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTTCGTGTGCTGGAGAAAG
 ATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCC
 AAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 19-2]

Trình tự axit amin của B7-H3 IgC1-V2-C2 (SEQ ID NO: 29)

APYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNTTTSQMANEQGLFDVH
 SILRVVLGANGTYSCLVNPNVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFS
 PEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVVADEGS
 FTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGV
 LTGNTTTSQMANEQGLFDVHSLRVVLGANGTYSCLVNPNVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWV
 TVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGESEKSKTALQPLKHSDDKEDDGQEI

[Fig. 20-1]

Trình tự nucleotit của B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 30)

GGAGCCGTGGAGGTCCAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCACCCTG
 CGCTGCTCCTTCTCCCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACA
 GACACCAAACAGCTGGTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGC
 ACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCGTGTG
 GCGGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTTCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTG
 CAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGG
 GACACGGTGACCATCACGTGCTCCAGCTACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGAT
 GGGCAGGGTGTGCCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTT
 GATGTGCACAGCGTCCTGCGGGTGGTGTGCGGATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGCGCAAC
 CCCGTGCTGCAGCAGGATGCGCACGGCTCTGTACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCA
 GAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTC
 GTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGG
 GAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGA
 CAAGAAATAGCCTGA

[Fig. 20-2]

Trình tự axit amin của B7-H3 IgV2-C2 (SEQ ID NO: 31)

GAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANR
 TALFPDLQAQGNASRLRQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPG
 DTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRN
 PVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDG
 EGECSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[Fig. 21-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể M30 (SEQ ID NO: 50)

atggaatggagttggatatatttctctttctcctgtcaggaactgcaggtgtccactctgaggtccag
ctgcagcagctctggacctgagctggtaaagcctggggcttcagtgaagatgtcctgcaaggcttct
ggatacacattcactaactatgtttatgcactgggtgaagcagaagcctgggcagggccttgagtgg
attggatatattaatccttacaatgatgatgttaagtacaatgagaagttcaaaggcaaggccaca
cagacttcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctcagcagcctgacctctgaggactct
gcggtctattactgtgcaagatgggggtactacggtagtcccttatactactttgactactggggc
caaggcaccactctcacagctctcctcagccaaaacaacagcccatcgggtctatccactggccct
gtgtgtggagatacaactggctcctcgggtgactctaggatgcctgggtcaagggttatttcctgag
ccagtgaccttgacctggaactctggatccctgtccagtgggtgtgcacacctcccagctgtcctg
cagtctgacctctacacctcagcagctcagtgactgtaacctcgagcacctggcccagccagtc
atcacctgcaatgtggccccaccggcaagcagcaccaagggtggacaagaaaattgagcccagaggg
cccacaatcaagccctgtcctccatgcaaatgcccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtc
ttcatcttccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctcctgagcccatagtcacatgtgtg
gtggtggatgtgagcgaggatgacctagatgtccagatcagctgggttgtgaacaacgtggaagta
cacacagctcagacacaaacccatagagaggattacaacagtactctccgggtgggtcagtgcctc
cccatccagcaccaggactggatgagtggcaaggagttcaaatgcaagggtcaacaacaagacctc
ccagcgcctcagagagaacctctcaaaacccaaagggtcagtaagagctccacaggtatatgtc
ttgctccaccagaagaagagatgactaagaaacagggtcactctgacctgcatggtcacagacttc
atgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacact
gaaccagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaac
tgggtggaaaagaatagctactcctgttcagtgggtccacgaggggtctgcacaatcaccacacgact
aagagcttctcccggactccgggtaaa

[Fig. 21-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể M30 (SEQ ID NO: 51)

MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWVKQKPGQGLEW
IGYINPYNDLVKYNEKFKGKATQTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYYSPLYFDYWG
QGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVL
QSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSV
FIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWLVNNEVHTAQTTQTHREDYNSTLRVVSAL
PIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDF
MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFYMSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT
KSFSRTPGK

[Fig. 22-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 52)

atggatttttctggtgcagattttcagcttcctgctaatacagtgcttcagtcataatgtccagagga
 caaattgtttctctcccagttctccaacaatcctgtctgcatctccaggggagaagggtcacaatgact
 tgcagggccagctcaagactaattttacatgcattggtatcagcagaagccaggatcctccccaaa
 ccctggattttatgccacatccaacctggcttctggagtccttgctcgcttcagtggtcagtggtct
 gggacctcttactctctcacaatcagcagagtgaggagctgaagatgctgccacttattactgccag
 cagtggaatagtaacccacccacggttcggtactgggaccaagctggagctgaaacgggctgatgct
 gcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagtttaacatctggaggtgcctcagtcgtg
 tgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtgggaagattgatggcagtgaaacga
 caaatggcgctcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagc
 accctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaag
 acatcaacttcacccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtg

[Fig. 22-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 53)

MDFLVQIFSFLNISASVIMSRGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSRLIYMHYQQKPGSSPK
 PWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTKLELKRADA
 APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMS
 TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[Fig. 23]

Trình tự ADN mã hóa tín hiệu gây tiết chuỗi κ của người, vùng hằng định chuỗi κ , và tín hiệu bổ sung poly-A ở người (SEQ ID NO: 56)

```

ggtaccacccaagctggctaggtaagcttgctagcgccaccatgggtgctgcagacccaggtgttca
tctccctgctgctgttgatctccggcgcatatggcgatatcgatgattaaacgtacggtggccg
ccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtgggtgt
gcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgcctgcagt
ccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagca
ccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagg
gcctgagctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtggttaggggcccgttttaaacgggtg
gcatccctgtgacccctcccagtgctctctctggccctggaagttgccactccagtgcccaccag
ccttgctcctaataaaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggg
gtggaggggggttggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcgggggtcta
ttgggaaccaagctggagtgagtgccacaatcttggtcactgcaatctccgcctcctgggttca
agcgattctcctgcctcagcctcccagagttgttgggattccaggcatgcatgaccagggtcaccta
atTTTTgtTTTTTTggtagagacggggtttcaccatattggccaggctgggtctccaactcctaatac
tcaggtgatctaccaccttgccctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctccacg
cgccctgtagcggcgcatthaagcgcggcggggtgtgggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttg
ccagcgccttagcgcgcctcctttcgcttttcttcccttctcgcacgcttcgcccggctttc
ccgtcaagctctaaatcgggggctcccttttaggggttcgatttagtgctttacggcacctcgacc
ccaaaaaacttgattaggggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatagacgggttttctgcc
ctttgacgttgaggtccacgttctttaatagtggaactcttggttccaaactggaacaacactcaacc
ctatctcggtctattcttttgatttataagggatTTTtgcgatttccggcctattgggttaaaaaatg
agctgatttaacaaaaatttaacgcgaatttaattctgtggaatgtgtgtcagttaggggtgtggaaa
gtccccagggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtg
tggaaggtccccagggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaac
catagtcgccgccctaactccgcccatcccgccctaactccgccagttccgccattctccgcc
ccatggctgactaattttttttatTTTatgcagaggccgaggccgcctctgcctctgagctattcca
gaagtagtgaggaggctTTTTTTggaggcctaggctTTTtgcaaaaagctccccggg

```

[Fig. 24]

Mảnh chức năng ADN chứa trình tự ADN mã hóa các axit amin của trình tự tín hiệu và vùng hằng định của IgG1 người (SEQ ID NO: 57)

tgctagcgccaccatgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgct
gagccaggtgcaattgtgcaggcggttagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctg
gcaccctcctccaagagcacctctggcgggcacagccgacctgggctgcctggtcaaggactacttc
cccgaacccgtgaccgtgagctggaactcaggcgacctgaccagcggcgtgcacaccttccccgct
gtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagccagcaaacaccaaggtggacaagagagttgag
cccaaattcttgtagaaaaactcacacatgcccacctgcccagcacctgaactcctgggggggacct
tcagtcttctcttccccccaaaacccaaggacacctctcatgatctcccggaacctgaggtcaca
tgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg
gaggtgcataatgccaagacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagc
gtcctcacctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaa
gccctcccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtg
tacacctgcccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaa
ggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaag
accaccttcccgtgctggactccgacggctccttcttctctctacagcaagctcacctggacaag
agcaggtggcagcagggcaacgtcttctctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactac
accagaagagcctctccctgtctctcccgcaaatgagatatcgggcccgttttaaacgggtggca

[Fig. 25-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại thể khảm của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 58)

```
atgggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggccaaatt
gttctctcccagttctccaacaatcctgtctgcatctccaggggagaaggtcacaatgacttgcagg
gccagctcaagactaattttacatgcattgggtatcagcagaagccaggatcctcccccacccctgg
atztatgccacatccaacctggcttctggagtccttgctcgcttcagtgggcagtggtctgggacc
tcttactctctcacaatcagcagagtgagggtgaagatgctgccacttattactgccagcagtg
aatagtaacccacccacgttcggtactgggaccaagctggagctgaaacgtacggtggccgcccc
tcggtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagtcggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgacccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg
```

[Fig. 25-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại thể khảm của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 59)

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSRLIYMHWYQQKPGSSPKPW
IYATSNLASGVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGKLELKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[Fig. 26-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại thể khảm của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 62)

atgaaacacctgtggttcttctcctgctgggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtccag
ctgcagcagctctggacctgagctggtaaagcctggggcttcagtgaagatgtcctgcaaggcttct
ggatacacattcactaactatgttatgcactgggtgaagcagaagcctgggcagggccttgagtgg
attggatatattaatccttacaatgatgatgttaagtacaatgagaagttcaaaggcaaggccaca
cagacttcagacaaatcctccagcacagcctacatggaactcagcagcctgacctctgaggactct
gcggtctattactgtgcaagatgggggtactacggtagtcccttatactactttgactactggggc
caaggcaccactctcacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcacc
tcctccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaa
cccgtagccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttccccgctgtcctg
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccag
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaa
tcttgtagacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc
ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtg
gtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcggtggaggtg
cataatgccaagacaaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtgggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctc
ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc
ctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacc
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccggtggacaagagcagg
tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag
aagagcctctccctgtctcccggcaaa

[Fig. 26-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại thể khảm của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 63)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWVKQKPGQGLEW
IGYINPYND DVKYNEKFKGKATQTS DKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYYSPLYFDYWG
QGTTLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF

24713

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[Fig. 27-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L1 (SEQ ID NO: 70)

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgagatc
gtgctgacccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagccgctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccgccaggccccagactgctg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc
gacttcaccctgaccatctctcggtggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtagcgtggccgcccc
tcggtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgcctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgagggtgaccaccaggggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg

[Fig. 27-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L1 (SEQ ID NO: 71)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRLL
IYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Fig. 28-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L2 (SEQ ID NO: 72)

atgggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgagatc
gtgctgacccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagcaggctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccgccaggccccagactgtgg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagattttctggcagcggcagcggcacc
gactacaccctgaccatcagccgcctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgcctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg

[Fig. 28-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L2 (SEQ ID NO: 73)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRLW
IYATSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Fig. 29-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L3 (SEQ ID NO: 74)

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggccagatc
gtgctgtcccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgacctgcaga
gccagcagcaggctgatctacatgcactggtatcagcagaagcccggcagcgcccccaagctgtgg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagattttctggcagcggcagcggcacc
agctacaccctgaccatctcccgctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtagggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtgggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgcctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgagggtgaccaccaggggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacagggggggagtgt

[Fig. 29-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L3 (SEQ ID NO: 75)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRASSRLIYMHWYQQKPGSAPKLW
IYATSNLASGIPARFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Fig. 30-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L4 (SEQ ID NO: 76)

```
atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgagatc
gtgctgaccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagccgcctgatctacatgcactggtatcagcagaagcccgccaggccccccagacctctg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc
gacttcaccctgaccatcagcagcctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgagggtgaccaccaggggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacagggggggagtgt
```

[Fig. 30-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L4 (SEQ ID NO: 77)

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPL
IYATSNLASGIPARFSGSGGTDFLTISLSEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

[Fig. 31-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L5 (SEQ ID NO: 78)

atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggccagatc
gtgctgtcccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgacctgcaga
gccagcagcaggctgatctacatgcactggtatcagcagaagcccggcagcgcccccaagccttgg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagattttctggcagcggcagcggcacc
agctacaccctgaccatctcccgctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacgggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgcctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg

[Fig. 31-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L5 (SEQ ID NO: 79)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRASSRLIYMHWYQQKPGSAPKPW
IYATSNLASGIPARFSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Fig. 32-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L6 (SEQ ID NO: 80)

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgagatc
gtgctgacccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagccgcctgatctacatgcactgggtatcagcagaagcccgccaggccccccagacctctg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagatcttctggcagcggcagcggcacc
gacttcaccctgaccatcagccgcctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtacggtggccgcccc
tcggtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctg
agctcccccgctcaccaagagcttcaacaggggggagtg

[Fig. 32-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L6 (SEQ ID NO: 81)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPL
IYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Fig. 33-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ loại M30-L7 (SEQ ID NO: 82)

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgagatc
gtgctgacccagagccccgccaccctgtctctgagccctggcgagagagccaccctgagctgcaga
gccagcagccgcctgatctacatgcactggtatcagcagaagcccggccaggccccccagacctctg
atctacgccaccagcaacctggccagcggcatccccgccagattttctggcagcggcagcggcacc
gactacaccctgaccatcagccgcctggaacccgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtgg
aacagcaacccccccaccttcggccagggcaccaaggtcgaaatcaagcgtagggtggccgcccc
tccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctg
ctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtccggg
aactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctg
accctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctg
agctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg

[Fig. 33-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại M30-L7 (SEQ ID NO: 83)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPL
IYATSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Fig. 34-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H1 (SEQ ID NO: 84)

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcag
ctggtgcagtcctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagc
ggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtgcgccaggccccctgggcagggactggaatgg
atgggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgagaagttcaagggcagagtgacc
atcacccgcgacgagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcgagcagaggacacc
gccgtgtactactgcgccagatggggctactacggcagccccctgtactacttcgactactggggc
cagggcaccctgggtgacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcacc
tctccaagagcaccctctggcggcacagccgcctgggtgctgctggtcaaggactacttccccgaa
cccgtagccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccag
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaa
tcttgtgacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc
ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtg
cataatgccaagacaaaagccccgggaggagcagtacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctc
ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc
ctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttc
tatccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacc
cctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacctgggacaagagcagg
tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag
aagagcctctccctgtctccccggcaaa

[Fig. 34-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H1 (SEQ ID NO: 85)

MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVRQ
APGQGLEWMGYINPYNDLVKYNKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARW
GYYGSPLYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Fig. 35-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H2 (SEQ ID NO: 86)

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcag
ctggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagc
ggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtgcgccaggccccctgggcagggactggaatgg
atcggctacatcaaccctacaacgacgacgtgaagtacaacgagaagttcaagggcagagtgacc
atcaccgcccagcagagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcagggacacc
gccgtgtactactgcgccagatggggctactacggcagccccctgtactacttcgactactggggc
cagggcaccctgggtgacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccc
tcctccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaa
cccgtgaccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccag
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaa
tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc
ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg
cataatgccaagacaaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctc
ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc
ctgcccccatccccgggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacc
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcaggggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag
aagagcctctccctgtctccccggcaaa

[Fig. 35-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H2 (SEQ ID NO: 87)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPGQGLEW
IGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGYYSPLYFDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[Fig. 36-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H3 (SEQ ID NO: 88)

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcag
 ctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagc
 ggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtgaaacaggccctgggcagggcctggaatgg
 atcggctacatcaacccctacaacgacgacgtgaagtacaacgagaagttcaagggcaaggccacc
 atcaccgcccagcagagacaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcagggacacc
 gccgtgtactactgcgccagatggggctactacggcagccccctgtactacttegactactggggc
 cagggcacccctggtgacagtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccc
 tcctccaagagcacctctggcgccacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaa
 cccgtgaccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg
 cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccag
 acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaa
 tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc
 ttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtg
 gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg
 cataatgccaagacaaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctc
 accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctc
 ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc
 ctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
 tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacc
 cctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag
 aagagcctctccctgtctctcccgcaaa

[Fig. 36-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H3 (SEQ ID NO: 89)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVKQAPGQGLEW
 IGYINPYNDVKYNEKFKGKATITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYSPLYFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

[Fig. 37-1]

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng loại M30-H4 (SEQ ID NO: 90)

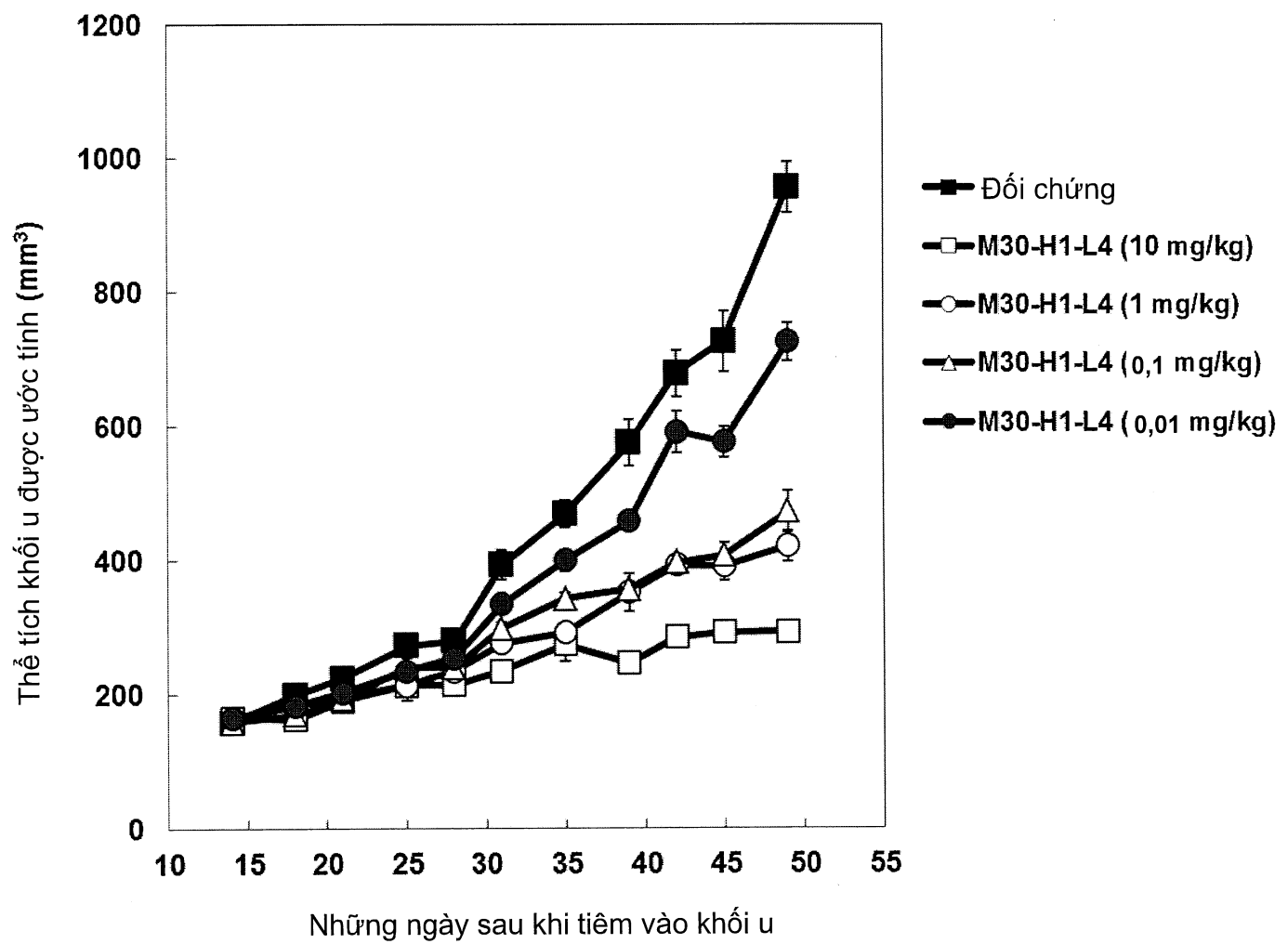
atgaaacacctgtggtttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcag
ctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcagcagcgtgaaggtgtcctgcaagggccagc
ggctacaccttcaccaactacgtgatgcactgggtcaagcaggccccctgggcagggcctggaatgg
atcggctacatcaacccctacaacgacgacgtgaagtacaacgagaagttcaagggcaagggccacc
cagaccagcgacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcgaggacacc
gccgtgtactactgcgccagatggggctactacggcagccccctgtactacttcgactactggggc
cagggcaccctgggtcacgcgtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccc
tcctccaagagcacctcttgccggcacagccgccctgggctgcttggtcaaggactacttccccgaa
cccgtgaccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctg
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagccttgggcacccag
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaa
tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtc
ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtg
cataatgccaagacaaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctc
ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacc
ctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacc
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccag
aagagcctctccctgtctccccggcaaa

[Fig. 37-2]

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại M30-H4 (SEQ ID NO: 91)

MKHLWFFLLLVAAPRWLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVKQAPGQGLEW
IGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQTSKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYSPLYYFDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[Fig. 38]



Danh mục trình tự

<110>	Daiichi Sankyo Company, Limited	
<120>	Kháng thể kháng B7-H3 và dược phẩm chứa kháng thể này	
<130>	DSPCT-FP1214	
<150>	JP 2011-097645	
<151>	2011-04-25	
<150>	US 61/478878	
<151>	2011-04-25	
<160>	97	
<170>	PatentIn version 3.4	
<210>	1	
<211>	46	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi PCR	
<400>	1	
	ctatagggag acccaagctg gctagcatgc tgcgtcggcg gggcag	46
<210>	2	
<211>	66	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi PCR	
<400>	2	
	aacgggccct ctagactcga gcggccgctc aggctatttc ttgtccatca tcttctttgc	60
	tgtcag	66
<210>	3	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi PCR	
<400>	3	
	cgcaaatggg cggtaggcgt g	21
<210>	4	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi PCR	
<400>	4	
	tagaaggcac agtcgagg	18

<210> 5
 <211> 1815
 <212> ADN
 <213> Người

<400> 5
 atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60
 ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtcc ctgaagaccc agtgggtggca 120
 ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180
 gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctgggtgca cagctttgct 240
 gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300
 gcacagggca acgcatccct gaggtgagc cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360
 acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgcccg tcagcctgca ggtggccgct 420
 ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480
 gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgagggtgtt ctggcaggat 540
 gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
 ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660
 ctggtgcgca acccctgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 720
 agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtcccctgagg acccgggtgtt ggccctagt 780
 ggcaccgatg ccacctgctg ctgtctcttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840
 ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 900
 cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacia 960
 ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcg acgagggcag cttcacctgc 1020
 ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtg gccgtcagcc tgcagggtggc cgctccctac 1080
 tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140
 atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag 1200
 ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt 1260
 gatgtgcaca gcgtcctgctg ggtgggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctgggtg 1320
 cgcaaccccc tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1380
 acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcaactg 1440
 ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1500
 gcaggagctg aggaccagga tggggagggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560
 aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctgagcggc cgccactgtg 1620
 ctggatatct gcagaattcc accacactgg actagtggat ccgagctcgg taccaagctt 1680
 aagtttaaac cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg 1740
 cccctcccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc ttctctaata 1800
 aaatgaggaa attgc 1815

<210> 6
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 6

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 20 25 30
 Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45
 Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60
 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65 70 75 80
 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110
 Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125
 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140
 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175
 Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
 180 185 190
 Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu
 195 200 205
 Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
 210 215 220
 Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln
 225 230 235 240

Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val
 245 250 255
 Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
 260 265 270
 Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr
 275 280 285
 Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly
 290 295 300
 Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln
 305 310 315 320
 Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
 325 330 335
 Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val
 340 345 350
 Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu
 355 360 365
 Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
 370 375 380
 Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
 385 390 395 400
 Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
 405 410 415
 Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
 420 425 430
 Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
 435 440 445
 Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
 450 455 460
 Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
 465 470 475 480
 Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
 485 490 495
 Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
 500 505 510

Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
 515 520 525

Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 530

<210> 7
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 7
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatgctg cgtcggcggg gcagccctg 59

<210> 8
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 8
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ggctatttct tgt 43

<210> 9
 <211> 948
 <212> ADN
 <213> Người

<400> 9
 atgctgctgc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60
 ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggctc ctgaagacc agtggtggca 120
 ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180
 gcacagctca acctatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 240
 gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300
 gcacagggca acgcatccct gaggtgagc cgcgtgctg tggcggacga gggcagcttc 360
 acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgctg tcagcctgca ggtggccgct 420
 ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480
 gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540
 gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
 ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc 660
 ctggtgagca acccctgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag 720
 cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt 780
 gcactgctgg tggccctggc tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag 840
 gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag 900

cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag⁻aatagcc

948

<210> 10
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 10

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
 145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
 180 185 190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
 195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
 210 215 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
 225 230 235 240

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
245 250 255

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
260 265 270

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
275 280 285

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290 295 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315

<210> 11
<211> 52
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 11
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cggagccctg gaggtccagg tc 52

<210> 12
<211> 55
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 12
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgctccctac tcgaagccca gcatg 55

<210> 13
<211> 52
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 13
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cggagccgtg gaggtccagg tc 52

<210> 14
<211> 55
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 14
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgctccctac tcgaagccca gcatg 55

<210> 15
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn môi PCR

 <400> 15
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcaggctatt tcttgtccat catc 54

 <210> 16
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn môi PCR

 <400> 16
 gggaatgtca taggctgccc ggccacctgc aggctgacgg cag 43

 <210> 17
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn môi PCR

 <400> 17
 gggaatgtca taggctgccc tgtggggctt ctctgggggtg tg 42

 <210> 18
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn môi PCR

 <400> 18
 gggaatgtca taggctgccc ggccacctgc aggctgacgg cag 43

 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn môi PCR

 <400> 19
 gggcagccta tgacattccc cccagag 27

 <210> 20
 <211> 576
 <212> ADN
 <213> Người

 <400> 20

ggagccctgg aggtccaggt ccctgaagac ccagtgggtgg cactgggtggg caccgatgcc 60
 accctgtgct gctccttctc ccctgagcct ggcttcagcc tggcacagct caacctcatc 120
 tggcagctga cagataccaa acagctggtg cacagctttg ctgagggcca ggaccagggc 180
 agcgcctatg ccaaccgcac ggccctcttc ccggacctgc tggcacaggg caacgcatcc 240
 ctgaggctgc agcgcgtgcg tgtggcggac gagggcagct tcacctgctt cgtgagcatc 300
 cgggatttcg gcagcgtgc cgtcagcctg caggtggccg ggcagcctat gacattcccc 360
 ccagaggccc tgtgggtgac cgtggggctg tctgtctgtc tcattgcact gctgggtggc 420
 ctggctttcg tgtgctggag aaagatcaaa cagagctgtg aggaggagaa tgcaggagct 480
 gaggaccagg atggggaggg agaaggctcc aagacagccc tgcagcctct gaaacactct 540
 gacagcaaag aagatgatgg acaagaaata gcctga 576

<210> 21
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 21

Gly Ala Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val
 1 5 10 15

Gly Thr Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe
 20 25 30

Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln
 35 40 45

Leu Val His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala
 50 55 60

Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys
 85 90 95

Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val
 100 105 110

Ala Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val
 115 120 125

Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val
 130 135 140

Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala
 145 150 155 160

24713

Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro
 165 170 175

Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 180 185 190

<210> 22
 <211> 552
 <212> ADN
 <213> Người

<400> 22
 gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac 60
 acggtgacca tcacgtgctc cagctaccag ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag 120
 gatgggcagg gtgtgcccct gactggcaac gtgaccacgt cgcagatggc caacgagcag 180
 ggcttgtttg atgtgcacag catcctgcgg gtggtgctgg gtgcaaattg cacctacagc 240
 tgcttggtgc gcaaccccggt gctgcagcag gatgcgcaca gctctgtcac catcacaccc 300
 cagagaagcc ccacagggca gcctatgaca ttccccccag aggccctgtg ggtgaccgtg 360
 gggctgtctg tctgtctcat tgcactgctg gtggccctgg ctttcgtgtg ctggagaaaag 420
 atcaaacaga gctgtgagga ggagaatgca ggagctgagg accaggatgg ggagggagaa 480
 ggctccaaga cagccctgca gcctctgaaa cactctgaca gcaaagaaga tgatggacaa 540
 gaaatagcct ga 552

<210> 23
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 23

Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu
 1 5 10 15

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

Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr
 35 40 45

Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp
 50 55 60

Val His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser
 65 70 75 80

Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val
 85 90 95

Thr Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro
 100 105 110

Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala
115 120 125

Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser
130 135 140

Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu
145 150 155 160

Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu
165 170 175

Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
180

<210> 24
<211> 576
<212> ADN
<213> Người

<400> 24
ggagccgtgg aggtccaggt ccctgaggac ccggtggtgg ccctagtggg caccgatgcc 60
accctgcgct gtcctttctc ccccgagcct ggcttcagcc tggcacagct caacctcatc 120
tggcagctga cagacaccaa acagctggtg cacagtttca ccgaaggccg ggaccagggc 180
agcgcctatg ccaaccgcac ggccctcttc ccggacctgc tggcacaagg caatgcatcc 240
ctgaggctgc agcgcgtgcg tgtggcggac gagggcagct tcacctgctt cgtgagcatc 300
cgggatttcg gcagcgctgc cgtcagcctg caggtggccg ggcagcctat gacattcccc 360
ccagaggccc tgtgggtgac cgtggggctg tctgtctgtc tcattgcact gctggtggcc 420
ctggctttcg tgtgctggag aaagatcaaa cagagctgtg aggaggagaa tgcaggagct 480
gaggaccagg atggggaggg agaaggctcc aagacagccc tgcagcctct gaaacactct 540
gacagcaaag aagatgatgg acaagaaata gcctga 576

<210> 25
<211> 191
<212> PRT
<213> Người

<400> 25

Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val
1 5 10 15

Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe
20 25 30

Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln
35 40 45

24713

Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala
50 55 60

Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys
85 90 95

Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val
100 105 110

Ala Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val
115 120 125

Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val
130 135 140

Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala
145 150 155 160

Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro
165 170 175

Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
180 185 190

<210> 26
<211> 534
<212> ADN
<213> Người

<400> 26
gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac 60
acggtgacca tcacgtgctc cagctaccgg ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag 120
gatgggcagg gtgtgcccct gactggcaac gtgaccacgt cgcagatggc caacgagcag 180
ggcttgtttg atgtgcacag cgtcctgcgg gtggtgctgg gtgcgaatgg cacctacagc 240
tgcctggtgc gcaaccccggt gctgcagcag gatgcgcacg gctctgtcac catcacaggg 300
cagcctatga cattcccccc agaggccctg tgggtgaccg tggggctgtc tgtctgtctc 360
attgcactgc tgggtggccct ggctttcgtg tgctggagaa agatcaaaca gagctgtgag 420
gaggagaatg caggagctga ggaccaggat ggggagggag aaggctccaa gacagccctg 480
cagcctctga aacactctga cagcaaagaa gatgatggac aagaaatagc ctga 534

<210> 27
<211> 177
<212> PRT
<213> Người
<400> 27

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

Ala

<210> 28
 <211> 1188
 <212> ADN
 <213> Người

<400> 28
 gctccctact cgaagcccag catgaccctg gagcccaaca aggacctgcg gccaggggac 60
 acggtgacca tcacgtgctc cagctaccag ggctaccctg aggctgaggt gttctggcag 120
 gatgggcagg gtgtgcccct gactggcaac gtgaccacgt cgcagatggc caacgagcag 180
 ggcttgtttg atgtgcacag catcctgcgg gtggtgctgg gtgcaaattg cacctacagc 240
 tgcctggtgc gcaaccccggt gctgcagcag gatgcgcaca gctctgtcac catcacaccc 300
 cagagaagcc ccacaggagc cgtggaggtc caggtccctg aggacccggt ggtggcccta 360
 gtgggcaccg atgccaccct gcgctgctcc ttctcccccg agcctggctt cagcctggca 420

cagctcaacc tcatctggca gctgacagac accaaacagc tggcgcacag tttcaccgaa 480
 ggccgggacc agggcagcgc ctatgccaac cgcacggccc tcttcccgga cctgctggca 540
 caaggcaatg catccctgag gctgcagcgc gtgcgtgtgg cggacgaggg cagcttcacc 600
 tgcttcgtga gcatccggga tttcggcagc gctgccgtca gcctgcaggt ggccgctccc 660
 tactcgaagc ccagcatgac cctggagccc aacaaggacc tgcggccagg ggacacgggtg 720
 accatcacgt gctccagcta ccggggctac cctgaggctg aggtgttctg gcaggatggg 780
 caggggtgtgc ccctgactgg caacgtgacc acgtcgcaga tggccaacga gcagggcttg 840
 tttgatgtgc acagcgtcct gcgggtggtg ctgggtgcga atggcaccta cagctgcctg 900
 gtgcgcaacc ccgtgctgca gcaggatgag cagggctctg tcaccatcac agggcagcct 960
 atgacattcc ccccagaggc cctgtgggtg accgtggggc tgtctgtctg tctcattgca 1020
 ctgctggtgg ccctggcttt cgtgtgctgg agaaagatca aacagagctg tgaggaggag 1080
 aatgcaggag ctgaggacca ggatggggag ggagaaggct ccaagacagc cctgcagcct 1140
 ctgaaacact ctgacagcaa agaagatgat ggacaagaaa tagcctga 1188

<210> 29
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 29

Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu
1 5 10 15

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

Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr
35 40 45

Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp
50 55 60

Val His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser
65 70 75 80

Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val
85 90 95

Thr Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val
100 105 110

Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg
115 120 125

Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu
130 135 140

Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu
 145 150 155 160
 Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro
 165 170 175
 Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg
 180 185 190
 Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe
 195 200 205
 Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro
 210 215 220
 Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val
 225 230 235 240
 Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe
 245 250 255
 Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser
 260 265 270
 Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg
 275 280 285
 Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro
 290 295 300
 Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro
 305 310 315 320
 Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val
 325 330 335
 Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys
 340 345 350
 Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp
 355 360 365
 Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser
 370 375 380
 Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 385 390 395

<210> 30
 <211> 873

<212> ADN
<213> Người

<400> 30
 ggagccgtgg aggtccaggt ccctgaggac ccggtggtgg ccctagtggg caccgatgcc 60
 accctgcgct gctccttctc ccccgagcct ggcttcagcc tggcacagct caacctcatc 120
 tggcagctga cagacaccaa acagctggtg cacagtttca ccgaaggccg ggaccagggc 180
 agcgcctatg ccaaccgcac ggccctcttc ccggacctgc tggcacaagg caatgcatcc 240
 ctgaggctgc agcgcgtgctg tgtggcggac gaggggcagct tcacctgctt cgtgagcatc 300
 cgggatttcg gcagcgtgc cgtcagcctg cagggtggccg ctccctactc gaagcccagc 360
 atgaccctgg agcccaacaa ggacctgcgg ccaggggaca cggtgaccat cacgtgctcc 420
 agctaccggg gctaccctga ggctgaggtg ttctggcagg atgggcaggg tgtgcccctg 480
 actggcaacg tgaccacgtc gcagatggcc aacgagcagg gcttgtttga tgtgcacagc 540
 gtcctgcggg tgggtgctggg tgcgaatggc acctacagct gcctggtgctg caaccccgtg 600
 ctgcagcagg atgcgcacgg ctctgtcacc atcacagggc agcctatgac attcccccca 660
 gaggccctgt gggtgaccgt ggggctgtct gtctgtctca ttgcactgct ggtggccctg 720
 gctttcgtgt gctggagaaa gatcaaacag agctgtgagg aggagaatgc aggagctgag 780
 gaccaggatg gggagggaga aggctccaag acagccctgc agcctctgaa acactctgac 840
 agcaaagaag atgatggaca agaaatagcc tga 873

<210> 31
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 31

Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val
 1 5 10 15

Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe
 20 25 30

Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln
 35 40 45

Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala
 50 55 60

Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys
 85 90 95

Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val
 100 105 110

Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp
 115 120 125

Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly
 130 135 140

Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe
 165 170 175

Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr
 180 185 190

Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser
 195 200 205

Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp
 210 215 220

Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu
 225 230 235 240

Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn
 245 250 255

Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala
 260 265 270

Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu
 275 280 285

Ile Ala
 290

<210> 32
 <211> 909
 <212> ADN
 <213> Người

<400> 32
 atgcggctgg gcagtcctgg actgctcttc ctgctcttca gcagccttcg agctgatact 60
 caggagaagg aagtcagagc gatggtaggc agcgacgtgg agctcagctg cgcttgccct 120
 gaaggaagcc gttttgattt aaatgatgtt tacgtatatt ggcaaaccag tgagtcgaaa 180
 accgtggtga cctaccacat cccacagaac agctccttgg aaaacgtgga cagccgctac 240
 cggaaccgag ccctgatgtc accggccggc atgctgcggg gcgacttctc cctgcgcttg 300
 ttcaacgtca cccccagga cgagcagaag tttcactgcc tgggtgttgag ccaatccctg 360

```

ggattccagg aggttttgag cgttgaggtt acactgcatg tggcagcaaa cttcagcgtg 420
cccgtcgtca gcgcccccca cagccccctcc caggatgagc tcaccttcac gtgtacatcc 480
ataaacggct accccaggcc caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg 540
gaccaggctc tgcagaatga caccgtcttc ttgaacatgc ggggcttgta tgacgtggtc 600
agcgtgctga ggatcgcacg gacccccagc gtgaacattg gctgctgcat agagaacgtg 660
cttctgcagc agaacctgac tgtcggcagc cagacaggaa atgacatcgg agagagagac 720
aagatcacag agaatccagt cagtaccggc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg 780
gctgtcctgt gcctgcttgt ggtcgtggcg gtggccatag gctgggtgtg cagggaccga 840
tgcctccaac acagctatgc aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcactggc 900
cacgtttga 909

```

<210> 33
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 33

Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu
1 5 10 15

Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp
20 25 30

Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn
35 40 45

Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr
50 55 60

Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe
85 90 95

Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His
100 105 110

Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val
115 120 125

Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser
130 135 140

Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser
145 150 155 160

Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp
 165 170 175
 Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn
 180 185 190
 Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr
 195 200 205
 Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln
 210 215 220
 Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp
 225 230 235 240
 Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 245 250 255
 Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala
 260 265 270
 Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly
 275 280 285
 Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val
 290 295 300

<210> 34
 <211> 873
 <212> ADN
 <213> Người

<400> 34
 atgaggatat ttgctgtctt tatattcatg acctactggc atttgctgaa cgcatttact 60
 gtcacgggtc ccaaggacct atatgtggta gagtatggta gcaatatgac aattgaatgc 120
 aaattcccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180
 gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaagggttca gcatagtagc 240
 tacagacaga gggcccggt gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300
 atcacagatg tgaaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgatcag ctatggtggt 360
 gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaaga 420
 attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaactga catgtcaggc tgagggctac 480
 cccaaggccg aagtcactctg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540
 accaccaatt ccaagagaga ggagaagctt ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600
 acaacaacta atgagatttt ctactgcact tttaggagat tagatcctga ggaaaccat 660
 acagctgaat tggatcatccc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aaggactcac 720
 ttggttaattc tgggagccat cttattatgc cttggtgtag cactgacatt catcttccgt 780

ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aaatgtggca tccaagatac aaactcaaag 840
aagcaaagtg atacacattt ggaggagacg taa 873

<210> 35
<211> 290
<212> PRT
<213> Người
<400> 35

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

24713

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 36
<211> 909
<212> ADN
<213> Người

<400> 36
atgcggtctgg gcagtccttgg actgctcttc ctgctcttca gcagccttcg agctgatact 60
caggagaagg aagtcagagc gatggtaggc agcgacgtgg agctcagctg cgcttgccct 120
gaaggaagcc gttttgattt aaatgatgtt tacgtatatt ggcaaaccag tgagtcgaaa 180
accgtggtga cctaccacat cccacagaac agctccttgg aaaacgtgga cagccgctac 240
cggaaccgag ccctgatgtc accggccggc atgctgctgg gcgacttctc cctgcgcttg 300
ttcaacgtca cccccagga cgagcagaag ttctactgcc tgggtgttgag ccaatccctg 360
ggattccagg aggttttgag cgttgagggt acactgcatg tggcagcaaa cttcagcgtg 420
cccgtcgtca gcgcccccca cagcccctcc caggatgagc tcaccttcac gtgtacatcc 480
ataaacggct accccaggcc caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg 540
gaccaggctc tgcagaatga caccgtcttc ttgaacatgc ggggcttgta tgacgtggtc 600
agcgtgctga ggatcgacag gacccccagc gtgaacattg gctgctgcat agagaacgtg 660
cttctgcagc agaacctgac tgtcggcagc cagacaggaa atgacatcgg agagagagac 720
aagatcacag agaatccagt cagtaccggc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg 780
gctgtcctgt gcctgcttgt ggtcgtggcg gtggccatag gctgggtgtg cagggaccga 840
tgcctccaac acagctatgc aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcactggc 900
cacgtttga 909

<210> 37
<211> 302
<212> PRT
<213> Người

<400> 37

Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu
1 5 10 15

Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp
 20 25 30
 Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn
 35 40 45
 Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr
 50 55 60
 Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr
 65 70 75 80
 Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe
 85 90 95
 Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His
 100 105 110
 Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val
 115 120 125
 Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser
 130 135 140
 Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser
 145 150 155 160
 Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp
 165 170 175
 Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn
 180 185 190
 Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr
 195 200 205
 Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln
 210 215 220
 Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp
 225 230 235 240
 Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
 245 250 255
 Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala
 260 265 270
 Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly
 275 280 285

Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val
 290 295 300

<210> 38
 <211> 867
 <212> ADN
 <213> Người

<400> 38
 atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
 cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
 gaagtgaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgtga agagctggca 180
 caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
 atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
 attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
 tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
 gacttccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
 atttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttggg aaatggagaa 540
 gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctggt 600
 agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
 ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720
 gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780
 tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
 agaagggaaa gtgtacgccc tgtatag 867

<210> 39
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 39

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
 35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
 50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
 65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
225 230 235 240

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
245 250 255

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
260 265 270

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
275 280 285

<210> 40

<211> 990

<212> ADN

<213> Người

<400> 40

atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60

tctggtgctg ctctcttgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120

caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180

gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240

aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggcct gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcattcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcctg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780
atggttttct gtctaattct atggaaaatg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840
aatgtggaa ccaacacaat ggagagggaa gagagtgaac agaccaagaa aagagaaaaa 900
atccatatac ctgaaagatc tgatgaagcc cagcgtgttt ttaaaagttc gaagacatct 960
tcatgcgaca aaagtgatac atgtttttag 990

<210> 41
<211> 329
<212> PRT
<213> Người
<400> 41

Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
20 25 30

Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
35 40 45

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
50 55 60

Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
65 70 75 80

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
85 90 95

Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
100 105 110

His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
115 120 125

Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
130 135 140

Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145 150 155 160

His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
165 170 175

Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
180 185 190

Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
195 200 205

Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
210 215 220

Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225 230 235 240

Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val
245 250 255

Ile Ile Cys Val Met Val Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys
260 265 270

Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu
275 280 285

Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro
290 295 300

Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser
305 310 315 320

Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe
325

<210> 42

<211> 849

<212> ADN

<213> Người

<400> 42

atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct	60
ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcaggga gacactccat cacagtcact	120
actgtcgctt cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct	180
gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc	240
catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatgtt cagaggccgg	300
acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggt gaaaaacgtg	360

caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caaggggaat 420
 gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat 480
 gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggt tccccagcc cacagtggc 540
 tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag 600
 ctgaactctg agaatgtgac catgaagggt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac 660
 aacacatact cctgtatgat tgaaaatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagtg 720
 acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg 780
 tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg 840
 ctaaaatag 849

<210> 43
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 43

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

Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
180 185 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
195 200 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
210 215 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
225 230 235 240

Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
245 250 255

Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu
260 265 270

Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
275 280

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Chuột nhắt trắng
<400> 44

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

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> Chuột nhắt trắng
<400> 45

Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser Ala Ser Pro
1 5 10

<210> 46
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 46
aagaattcat ggaatggagt tggata

26

<210> 47
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>		
<223>	Đoạn mồi PCR	
<400>	47	
aagatatctc atttaccgag agtccgggag aa		32
<210>	48	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi PCR	
<400>	48	
aagaattcat ggattttctg gtgcag		26
<210>	49	
<211>	32	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi PCR	
<400>	49	
aagatatctt aacactcatt cctgttgaag ct		32
<210>	50	
<211>	1413	
<212>	ADN	
<213>	Chuột nhắt trắng	
<400>	50	
atggaatgga gttggatatt tctctttctc ctgtcaggaa ctgcagggtgt ccactctgag	60	
gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gtaaagcctg gggcttcagt gaagatgtcc	120	
tgcaaggctt ctggatacac attcactaac tatgttatgc actgggtgaa gcagaagcct	180	
gggcagggcc ttgagtggat tggatatatt aatccttaca atgatgatgt taagtacaat	240	
gagaagttca aaggcaaggc cacacagact tcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300	
gagctcagca gcctgacctc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atgggggtac	360	
tacggtagtc ctttatacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	420	
tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat ccactggccc ctgtgtgtgg agatacaact	480	
ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg	540	
acctggaact ctggatccct gtccagtggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct	600	
gacctctaca ccctcagcag ctccagtact gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc	660	
atcacctgca atgtggccca cccggcaagc agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc	720	
agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaagcc cagcacctaa cctcttgggt	780	
ggaccatccg tcttcatctt ccttccaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc	840	
cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc	900	

tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gctcagacac aaacccatag agaggattac 960
 aacagtactc tccgggtggt cagtgccctc cccatccagc accaggactg gatgagtggc 1020
 aaggagttca aatgcaaggt caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc 1080
 tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca caggatatg tcttgctcc accagaagaa 1140
 gagatgacta agaaacaggt cactctgacc tgcattgtca cagacttcac gcctgaagac 1200
 atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca 1260
 gtcctggact ctgatggttc ttacttcacg tacagcaagc tgagagtggg aaagaagaac 1320
 tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca gtgggtccac agggctctga caatcaccac 1380
 acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aaa 1413

<210> 51

<211> 471

<212> PRT

<213> Chuột nhắt trắng

<400> 51

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
130 135 140

Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr
145 150 155 160

Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
 195 200 205
 Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro
 225 230 235 240
 Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
 260 265 270
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
 290 295 300
 Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
 355 360 365
 Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
 385 390 395 400
 Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
 450 455 460

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 465 470

<210> 52
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Chuột nhắt trắng

<400> 52
 atggattttc tgggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttgtttctctc ccagtctcca acaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcacaatga cttgcagggc cagctcaaga ctaatttaca tgcattggta tcagcagaag 180
 ccaggatcct cccccaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcct 240
 gctcgttca gtggcagtg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtgggaata gtaaccacc cacgttcggt 360
 actgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
 ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 480
 taccctaaag acatcaatgt caagtgaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgctc 540
 ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc 600
 acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 660
 acatcaactt caccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgt 705

<210> 53
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt trắng

<400> 53

Met Asp Phe Leu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Ser Arg Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

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

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

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
165 170 175

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

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

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

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

<210> 54
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 54
ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagc

28

<210> 55
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 55
aaacccggga gctttttgca aaagcctagg

30

<210> 56
<211> 1704
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tín hiệu tiết chuỗi κ của người, vùng hằng định chuỗi κ ở người và tín hiệu bổ sung poly A của người

<400> 56

```

ggtagcaccac aagctggcta ggtaagcttg ctagcgccac catgggtgctg cagacccagg      60
tggtcatctc cctgctgctg tggatctccg gcgcataatg cgatatcgtg atgattaaac      120
gtacggtagc cgccccctcc gtgttcatct tccccccctc cgacgagcag ctgaagtccg      180
gcaccgcctc cgtgggtgtg ctgctgaata acttctaccc cagagaggcc aaggtgcagt      240
ggaaggtgga caacgccctg cagtccggga actcccagga gagcgtgacc gagcaggaca      300
gcaaggacag cacctacagc ctgagcagca ccctgaccct gagcaaagcc gactacgaga      360
agcacaaggt gtacgcctgc gaggtgaccc accagggcct gagctcccc gtcaccaaga      420
gcttcaacag gggggagtgt taggggccc tttaaacggg tggcatccct gtgacccctc      480
cccagtgctc ctcttgcccc tggaagtgtg cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaata      540
aaaattaagt tgcatcattt tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tgggggtggag      600
gggggtggta tggagcaagg ggcaagtgtg gaagacaacc ttaggggcct gcgggggtcta      660
ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc actgcaatct ccgcctcctg      720
ggttcaagcg attctcctgc ctacgcctcc cgagttgttg ggattccagg catgcatgac      780
caggctcacc taatttttgt ttttttggtg gagacgggtt ttcaccatat tggccaggct      840
ggtctccaac tcctaattct aggtgatcta cccaccttgg cctcccaaata tgctgggatt      900
acaggcgtga accactgctc cacgcgccct gtagcggcgc attaacgcgc gcgggtgtgg      960
tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcggccgct ctttcgctt      1020
tcttccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc      1080
tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg      1140
gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg      1200
agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct      1260
cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg      1320
agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg      1380
tggaaggtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc      1440
agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca      1500
tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc      1560
gcccagttcc gccattctc cgcccatggt ctgactaatt tttttatatt atgcagaggc      1620
cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct      1680
aggcttttgc aaaaagctcc cggg                                     1704

```

<210> 57

<211> 1120

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tín hiệu IgG1 ở người và vùng hằng định

<400> 57

tgctagcgcc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg	60
gggtgtgagc caggtgcaat tgtgcaggcg gttagctcag cctccaccaa gggcccaagc	120
gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc	180
ctggtcaagg actacttccc cgaaccctg accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc	240
agcggcgtgc acaccttccc cgctgtcctg cagtcctcag gactctactc cctcagcagc	300
gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac	360
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac	420
acatgcccac cctgcccagc acctgaactc ctggggggac cctcagtctt cctcttcccc	480
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg	540
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	600
cataatgcc agacaaagcc ccgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc	660
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc	720
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg ccagccccgg	780
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc	840
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat	900
ggccagccc agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	960
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcagggcaa cgtcttctca	1020
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacc agaagagcct ctccctgtct	1080
cccggcaaat gagatatcg gcccgtttaa acgggtggca	1120

<210> 58

<211> 699

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của M30 thể khảm

<400> 58

atggtgctgc agaccagggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcattatggc	60
caaattgttc tctcccagtc tccaacaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggcaca	120
atgacttgca gggccagctc aagactaatt tacatgcatt ggtatcagca gaagccagga	180
tcctccccc aacctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc	240
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagagt ggaggctgaa	300
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg aatagtaacc caccacggt cggtactggg	360
accaagctgg agctgaaacg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc	420

gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660
 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 59

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của M30 thể khám

<400> 59

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 60
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 60
aaacatatgg ccaaattggt ctctcccagt ctccaacaat cc 42

<210> 61
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi PCR

<400> 61
aaacgtacgt ttcagctcca gcttggtccc agtaccg 37

<210> 62
<211> 1413
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của M30 thể khảm

<400> 62
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60
gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gtaaagcctg gggcttcagt gaagatgtcc 120
tgcaaggctt ctggatacac attcactaac tatgttatgc actgggtgaa gcagaagcct 180
gggcagggcc ttgagtggat tggatatatt aatccttaca atgatgatgt taagtacaat 240
gagaagttca aaggcaaggc cacacagact tcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
gaactcagca gcctgacctc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atgggggtac 360
tacggtagtc cttatacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtcagc 420
tcagcctcca ccaaggggcc aagcgtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 480
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540
agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600
tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660

```

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780
ggaccctcag tcttcctctt cccccaaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
accagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

```

<210> 63

<211> 471

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng của M30 thể khảm

<400> 63

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 64
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 64
 aaagctgagc gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag 40

<210> 65
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 65
 gaggtcaggc tgctgagttc catgtaggct gtgctg 36

<210> 66
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 66
 cagcacagcc tacatggaac tcagcagcct gacctc 36

<210> 67
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 67
 aaagctgagc tgactgtgag agtggtgcct tggccccag 39

<210> 68
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 68
 aaagctgagc gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag 40

<210> 69
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PCR

<400> 69
 aaagctgagc tgactgtgag agtgggtgcct tggccccag 39

<210> 70
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 70
 atgggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc 60
 gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120
 ctgagctgca gagccagcag ccgcctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180
 caggccccca gactgctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240
 ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tctctcggct ggaacccgag 300
 gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc 360
 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660
 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 71
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 71

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110
 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 72

<211> 699

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 72
 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc 60
 gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120
 ctgagctgca gagccagcag caggctgac tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180
 caggccccca gactgtggat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240
 ttttctggca gcggcagcgg caccgactac accctgacca tcagccgcct ggaacccgag 300
 gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc ccccccacctt cggccagggc 360
 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660
 agtcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 73
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 73

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60
 Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110
 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 74

<211> 699

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 74

atgggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcataatggc	60
cagatcgtgc tgtcccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc	120
ctgacctgca gagccagcag caggctgata tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc	180
agcgccccca agctgtggat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga	240
ttttctggca gcggcagcgg caccagctac acctgacca tctccgcct ggaacccgag	300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc ccccccacctt cggccagggc	360
accaaggtcg aaatcaagcg tacgggtggc gccccctccg tggtcatctt cccccctcc	420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc	480
agagaggcca aggtgcagtg gaagggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag	540
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggctg tacgcctgag aggtgaccca ccagggcctg	660
agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtg	699

<210> 75

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 75

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 76

<211> 699

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 76

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc      60
gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc      120
ctgagctgca gagccagcag ccgcctgata tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc      180
caggccccca gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga      240
ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagcagcct ggaacccgag      300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc ccccccacctt cggccagggc      360
accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc      420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc      480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag      540
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg      600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggta tacgcctgca aggtgaccca ccagggcctg      660
agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt      699

```

<210> 77

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 77

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1          5          10          15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20          25          30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35          40          45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50          55          60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65          70          75          80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85          90          95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100         105         110

```

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 78
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 78
 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc 60
 cagatcgctgc tgtcccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120
 ctgacctgca gagccagcag caggctgata tacatgcact ggtatcagca gaagcccgcc 180
 agcgccccca agccttgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240
 ttttctggca gcggcagcgg caccagctac accctgacca tctccgcct ggaacccgag 300
 gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc ccccccctt cggccagggc 360
 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gcccctccg tgttcatctt cccccctcc 420
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc ttagcagcac cctgaccctg 600
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660
 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 79

<211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 79

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
 50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 80
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 80
 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc 60
 gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 120
 ctgagctgca gagccagcag ccgcctgata tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 180
 caggccccca gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 240
 ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagccgcct ggaacccgag 300
 gacttcgccg tgtactactg ccagcagtg aacagcaacc ccccccactt cggccagggc 360
 accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc 420
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480
 agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540
 agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
 agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgacca ccagggcctg 660
 agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtg 699

<210> 81
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 81

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 82

<211> 699

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 82

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcatatggc      60
gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc      120
ctgagctgca gagccagcag ccgcctgata tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc      180
caggccccca gacctctgat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga      240
ttttctggca gcggcagcgg caccgactac accctgacca tcagccgcct ggaacccgag      300
gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg aacagcaacc cccccacctt cggccagggc      360
accaaggtcg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccctcc      420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc      480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag      540
agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg      600
agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccga ccagggcctg      660

```

agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt

699

<210> 83

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ được làm giống người của M30

<400> 83

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 84
<211> 1413
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng được làm giống người của M30

<400> 84
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc 120
tgcaaggcca gcggctacac cttcaccaac tacgtgatgc actgggtgcg ccaggcccct 180
gggcagggac tggaatggat gggctacatc aacccttaca acgacgacgt gaagtacaac 240
gagaagttca agggcagagt gaccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgcctacatg 300
gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac 360
tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggg gacagtcagc 420
tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 480
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540
agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600
tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780
ggaccctcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 840
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccccggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgggtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtc aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctgca caaccactac 1380
accagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

<210> 85
<211> 471
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng được làm giống người của M30

<400> 85

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

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 86

<211> 1413

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng được làm giống người của M30

<400> 86

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag

60

gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc 120
 tgcaaggcca gcggctacac cttcaccaac tacgtgatgc actgggtgcg ccaggcccct 180
 gggcagggac tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac 240
 gagaagttca agggcagagt gaccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgcctacatg 300
 gaactgagca gcctgctggag cgaggacacc gccgtgtact actgctccag atggggctac 360
 tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggg gacagtcagc 420
 tcagcctcca ccaaggggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 480
 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540
 agctggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780
 ggaccctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
 cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
 tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960
 aacagcacgt accgggtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atccccgggag 1140
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatggccag ccgagaaca actacaagac caccctccc 1260
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
 acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

<210> 87

<211> 471

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng được làm giống người của M30

<400> 87

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

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 88
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng được làm giống người của M30

<400> 88
 atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaaggtgtcc 120
 tgcaaggcca gcggctacac cttcaccaac tacgtgatgc actgggtgaa acaggcccct 180
 gggcagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac 240
 gagaagttca agggcaaggc caccatcacc gccgacgaga gcaccagcac cgcctacatg 300
 gaactgagca gcctgctggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac 360
 tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggg gacagtcagc 420
 tcagcctcca ccaaggggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540

```

agctggaact cagggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600
tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
cccaaactct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780
ggaccctcag tcttcctctt cccccaaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
cctgagggtca catgcgtgggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgggtgggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 1380
accagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

```

<210> 89

<211> 471

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng được làm giống người của M30

<400> 89

```

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

```

```

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20          25          30

```

```

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35          40          45

```

```

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

```

```

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65          70          75          80

```

```

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
85          90          95

```

```

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100          105          110

```

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 90

<211> 1413

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng được làm giống người của M30

<400> 90

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag	60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcagcagcgt gaagggtgcc	120
tgcaaggcca gcggctacac cttaccaaac tacgtgatgc actgggtcaa gcaggcccct	180
gggcagggcc tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacgacgt gaagtacaac	240
gagaagttca agggcaaggc caccagacc agcgacaaga gcaccagcac cgcctacatg	300
gaactgagca gcctgctggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag atggggctac	360
tacggcagcc ccctgtacta cttcgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtcagc	420
tcagcctcca ccaagggcc aagcgtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct	480
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggtc aaggactact tcccgaacc cgtgaccgtg	540
agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccgcgtgt cctgcagtcc	600
tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag	720
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg	780
ggaccctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	840
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac	960
aacagcacgt accgggtggg cagcgtcttc accgtctctgc accaggactg gctgaatggc	1020

24713

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aaggccagcc ccggaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1140
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac caccctccc 1260
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
 acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

<210> 91

<211> 471

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng được làm giống người của M30

<400> 91

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 92
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt trắng
 <400> 92

Asn Tyr Val Met His
 1 5

<210> 93
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt trắng
 <400> 93

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 94
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt trắng
 <400> 94

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt trắng
 <400> 95

Arg Ala Ser Ser Arg Leu Ile Tyr Met His
 1 5 10

<210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt trắng
 <400> 96

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt trắng
<400> 97

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
1 5