



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

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

(11)



1-0025904

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2014-01761

(22) 05/11/2012

(86) PCT/EP2012/071833 05/11/2012

(87) WO2013/064685 10/05/2013

(30) 11306416.6 03/11/2011 EP

(45) 26/10/2020 391

(43) 27/10/2014 319A

(73) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)

45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt, FRANCE

(72) BEAU-LARVOR Charlotte (FR); GOETSCH Liliane (FR); BOUTE Nicolas (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PROTEIN GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN, TẾ BÀO LAI, THỂ TIẾP HỢP MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP MIỄN DỊCH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, cụ thể kháng thể đơn dòng, có khả năng gắn kết đặc hiệu với protein Axl cũng như các trình tự axit amin và axit nucleic mã hoá protein này. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên, có khả năng gắn kết đặc hiệu với Axl và, được nội hóa vào tế bào cùng với quá trình nội hóa Axl. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng protein gắn kết kháng nguyên này làm chất định địa chỉ cho các hợp chất điều trị ung thư khác, như độc tố, các nguyên tố phóng xạ hoặc thuốc, để điều trị một số bệnh ung thư nhất định.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, cụ thể là kháng thể đơn dòng, có khả năng gắn kết đặc hiệu với protein Axl, cũng như các trình tự axit amin và axit nucleic mã hoá protein này. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên, có khả năng gắn kết đặc hiệu với Axl và được nội hóa vào tế bào nhờ việc gây ra quá trình nội hóa của Axl. Sáng chế cũng mô tả ứng dụng protein gắn kết kháng nguyên này làm chất định địa chỉ (addressing product) cho các hợp chất điều trị ung thư khác, như độc tố, nguyên tố phóng xạ hoặc thuốc, và sử dụng nó để điều trị một số bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

“Axl” (còn được gọi là “Ufo”, “Ark” hoặc “Tyro7”) được tách dòng từ các bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính như là một gen gây ung thư gây ra quá trình biến đổi khi được biểu hiện quá mức ở chuột NIH3T3. Nó thuộc họ thụ thể tyrosin kinaza (RTK) được gọi là họ TAM (Tyro3, Axl, Mer) bao gồm Tyro3 (Rse, Sky, Dtk, Etk, Brt, Tif), Axl, và Mer (Eyf, Nyk, Tyro-12) [Lemke G. Nat. Rev. Immunol. (2008).8, 327-336].

Protein Axl ở người là protein gồm 894 axit amin, có trình tự được thể hiện trong danh mục trình tự là SEQ ID NO. 29. Các axit amin 1-25 tương ứng với peptit tín hiệu, protein Axl ở người, không có tín hiệu peptit này, được thể hiện trong danh mục trình tự là SEQ ID NO. 30.

Gas6, ban đầu được phân lập dưới dạng gen đặc hiệu hãm tăng trưởng, là phối tử thông thường cho các thành viên trong họ TAM [Varnum B.C. et al. Nature (1995).373, 623-626]. Gas6 có ái lực cao nhất đối với Axl, tiếp theo là Tyro3 và cuối cùng là Mer [Nagata K. et al. J. Biol. Chem. (1996).271, 30022-30027]. Gas6 được cấu thành bởi miền giàu γ -carboxyglutamat (Gla) là trung gian gắn kết với màng phospholipit, bốn miền giống yếu tố sinh trưởng biểu bì, và hai miền giống laminin G (LG) [Manfioletti G., Brancolini, C., Avanzi, G. & Schneider, C. Mol. Cell Biol. (1993).13, 4976-4985]. Như nhiều thụ thể tyrosin kinaza (receptor tyrosine kinase - RTK) khác, sự gắn kết phối tử gây ra quá trình dimer hóa thụ thể và quá trình tự

phosphoryl hóa của các gốc tyrosin (các gốc tyrosin 779, 821 và 866 của thụ thể Axl) có tác dụng như các vị trí neo đối với nhiều phân tử truyền tín hiệu nội bào [Linger R.M. Adv. Cancer Res. (2008).100, 35-83]. Ngoài ra, thụ thể Axl có thể được hoạt hóa thông qua quá trình không phụ thuộc phối tử. Quá trình hoạt hóa này có thể xảy ra khi thụ thể Axl được biểu hiện quá mức.

Việc truyền tín hiệu Gas6/Axl được cho là để điều hòa các quá trình khác nhau của tế bào bao gồm quá trình tăng sinh, quá trình bám dính, quá trình di trú và quá trình sống sót của tế bào ở rất nhiều tế bào *in vitro* [Hafizi S. & Dahlback, B. FEBS J. (2006).273, 5231-5244]. Ngoài ra, các thụ thể TAM tham gia vào việc kiểm soát miễn dịch bẩm sinh; chúng ức chế đáp ứng viêm đối với các tác nhân gây bệnh ở các tế bào đuôi gai (dendritic cell-DC) và đại thực bào. Chúng cũng điều khiển quá trình thực bào các tế bào chết theo chương trình bằng các tế bào miễn dịch này và chúng là cần thiết đối với quá trình trưởng thành và hoạt động gây chết của các tế bào gây chết tự nhiên (natural killer-NK) [Lemke G. Nat. Rev. Immunol. (2008).8, 327-336].

Được biểu hiện yếu trên các tế bào bình thường, nó chủ yếu được quan sát thấy ở các nguyên bào sợi, các tủy bào tổ tiên, đại thực bào, các mô thần kinh, tim và cơ xương nơi nó hỗ trợ chủ yếu cho quá trình sống sót của tế bào. Hệ Gas6/Axl này đóng vai trò quan trọng trong sinh học mạch máu bằng cách điều hòa quá trình nội cân bằng của tế bào trơn cơ trong mạch máu [Korshunov V.A., Mohan, A.M., Georger, M.A. & Berk, B.C. Circ. Res. (2006).98, 1446-1452; Korshunov V.A., Daul, M., Massett, M.P. & Berk, B.C. Hypertension (2007).50, 1057-1062].

Trong các tế bào khối u, Axl đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa quá trình xâm lấn và di trú của tế bào. Sự biểu hiện quá mức của Axl không những liên quan đến tiên lượng xấu mà còn liên quan đến mức độ xâm lấn tăng của các bệnh ung thư khác nhau ở người, như các bệnh ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư thực quản, ung thư tế bào gan, ung thư dạ dày, u thần kinh đệm, ung thư phổi, u melanin, bệnh sacôm xương, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, bệnh sacôm cơ vân, ung thư thận, ung thư tuyến giáp và ung thư nội mạc tử cung [Xem Linger R.M. Adv. Cancer Res. (2008).100, 35-83 and Verma A. Mol. Cancer Ther. (2011).10, 1763-1773]. Trong ung thư vú, Axl dường như là yếu tố gây ảnh hưởng mạnh đến quá trình chuyển tiếp biểu mô-trung mô (EMT); quá trình EMT góp phần tích cực

vào quá trình di trú và phát tán của các tế bào ung thư trong cơ thể [Thiery J.P. Curr. Opin. Cell Biol. (2003).15, 740-746].

Axl cũng thể hiện tác dụng điều hòa quá trình tạo mạch. Thực vậy, việc làm bất hoạt Axl ở các tế bào nội mô đã làm suy yếu quá trình tạo ống và quá trình di trú [Holland S.J. et al. Cancer Res. (2005).65, 9294-9303] cũng như gây nhiễu cho đường truyền tín hiệu tạo mạch đặc hiệu [Li Y. et al. Oncogene (2009).28, 3442-3455].

Một số nghiên cứu gần đây hơn trên một loạt mô hình thử nghiệm tế bào đã cho thấy mối liên quan của sự biểu hiện quá mức Axl với hiện tượng kháng thuốc. Bảng 1 dưới đây tóm tắt các nghiên cứu này.

Bảng 1

Tài liệu	Loại ung thư	Chất điều trị	Mô hình thử nghiệm trên tế bào
Macleod et al., 2005	Ung thư buồng trứng	Cisplatin	PE01/PE01CDDP
Mahadevan et al., 2007	GIST	Chất ức chế Imatinib c- kit/PDGFR	GIST882 >GIST-R
Lay et al., 2007	NSCLC	Doxorubicin	Dòng CL-1 dòng CL1-5F4
Hong et al., 2008	AML	Doxorubicin/Cisplatin	U937
Liu et al., 2009	Ung thư vú	Lapatinib (chất ức chế HER1 và HER2)	HER2 (+) BT474 (J4)
Keating et al., 2010	U bào hình sao	Temozolomit Carboplatin	G12 A172
Ye et al., 2010	NSCLC	Erlotinib	HCC827

Các tài liệu được trích dẫn trong bảng 1 trên đây có tên đầy đủ như sau:

- Macleod, K. et al. Cancer Res. (2005).65, 6789-6800
- Mahadevan D. et al. Oncogene (2007).26, 3909-3919
- Lay J.D. et al. Cancer Res. (2007).67, 3878-3887
- Hong C.C. et al. Cancer Lett. (2008).268, 314-324
- Liu L. et al. Cancer Res. (2009).69, 6871-6878
- Keating A.K. et al. Mol. Cancer Ther. (2010).9, 1298-1307
- Ye X. et al. Oncogene (2010).29, 5254-5264

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trong bản mô tả này, RTK Axl được coi là đích quan tâm trong điều trị bệnh ung thư. Một số nhóm nghiên cứu đã phát triển chiến lược kháng u bằng cách hướng đích tới trục *gas6/Axl*, sử dụng các kháng thể đơn dòng để trần hoặc các phân tử nhỏ được định hướng [Verma A. *Mol. Cancer Ther.* (2011).10, 1763-1773].

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, i) gắn kết đặc hiệu với protein Axl ở người, và ii) được nội hóa sau khi gắn kết với protein Axl ở người.

Một cách tổng quát, sáng chế mô tả việc sử dụng protein Axl để chọn lọc protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, có khả năng được nội hóa sau khi gắn kết với đích Axl này. Cụ thể hơn, đích này là miền ngoại bào của Axl.

Do vậy, theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp *in vitro* để sàng lọc hợp chất, hoặc đoạn gắn kết của nó, có khả năng vận chuyển hoặc nội hóa phân tử quan tâm vào các tế bào động vật có vú, phân tử quan tâm này được liên kết cộng hóa trị với hợp chất này, bao gồm các bước sau:

- a) chọn hợp chất có khả năng gắn kết đặc hiệu với protein Axl, hoặc miền ngoại bào (ECD) của nó, hoặc epitop của nó;
- b) tùy ý, cho phân tử quan tâm này, hoặc phân tử điều khiển, liên kết cộng hóa trị với hợp chất được chọn ở bước a) để tạo ra phức hợp;
- c) cho hợp chất được chọn ở bước a), hoặc phức hợp thu được ở bước b), tiếp xúc với tế bào động vật có vú, tốt hơn là tế bào sống, cho protein Axl, hoặc đoạn chức năng của nó, biểu hiện trên bề mặt tế bào;
- d) xác định xem hợp chất, hoặc phân tử quan tâm hoặc phức hợp nêu trên, đã được vận chuyển nội bào hoặc được nội hóa vào tế bào động vật có vú hay chưa; và
- e) chọn hợp chất nêu trên làm hợp chất có khả năng vận chuyển hoặc nội hóa phân tử quan tâm trong tế bào sống của động vật có vú.

Theo phương án ưu tiên, hợp chất nêu trên có khả năng vận chuyển hoặc nội hóa phân tử quan tâm vào tế bào sống của động vật có vú là protein (trong bản mô tả này còn được gọi là polypeptit hoặc peptit) hoặc hợp chất giống protein bao gồm cấu trúc peptit, đặc biệt là trình tự axit amin có ít nhất 5, 10, 15 gốc axit amin hoặc nhiều hơn, các gốc axit amin này có thể được glycosyl hoá.

Khi hợp chất nêu trên có khả năng vận chuyển hoặc nội hóa phân tử quan tâm trong tế bào sống của động vật có vú là protein hoặc hợp chất giống protein, thì trong bản mô tả này, hợp chất này còn được gọi là “protein gắn kết kháng nguyên”, protein gắn kết kháng nguyên này, hoặc đoạn gắn kết của nó, có thể:

- i) gắn kết đặc hiệu với protein Axl, tốt hơn là protein Axl ở người, và
- ii) được nội hóa vào tế bào động vật có vú sau khi gắn kết với protein Axl khi protein Axl này được biểu hiện trên bề mặt của tế bào động vật có vú nêu trên.

Theo phương án ưu tiên, tế bào sống ở động vật có vú nêu trên là tế bào người, tốt hơn là tế bào biểu hiện tự nhiên thụ thể protein Axl.

Theo phương án cụ thể, các tế bào sống ở động vật có vú ở bước c) là các tế bào động vật có vú biểu hiện (các) protein Axl tái tổ hợp trên bề mặt của nó.

Theo phương án ưu tiên khác, phân tử quan tâm nêu trên là phân tử gây độc tế bào (trong bản mô tả này, còn được gọi là tác nhân gây độc tế bào hoặc kim hãm tế bào).

Theo phương án ưu tiên khác, phân tử quan tâm nêu trên được liên kết cộng hóa trị với hợp chất có khả năng gắn kết protein Axl nêu trên bằng phân tử liên kết, tốt hơn là phân tử liên kết peptit, tốt hơn nữa là phân tử liên kết peptit có thể phân giải được, tốt hơn nữa là phân tử liên kết có thể được phân giải bởi các hợp chất nội bào tự nhiên có trong tế bào động vật có vú, đặc biệt là trong dịch bào của tế bào động vật có vú nêu trên.

Theo phương án ưu tiên khác, hợp chất có khả năng gắn kết protein Axl nêu trên là kháng thể, hoặc đoạn chức năng gắn kết của nó, được định hướng đặc hiệu kháng protein Axl, hoặc kháng epitop của nó nằm trong miền EDC Axl.

Bước chọn lọc e) có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết để đánh giá việc vận chuyển hoặc nội hóa nội bào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đều biết thử nghiệm hoặc thí nghiệm có khả năng chứng minh hoặc đánh giá sự có mặt hoặc không có mặt, hoặc hoạt tính của hợp chất có khả năng gắn kết đặc hiệu với protein Axl nêu trên, hoặc phức hợp được tạo thành bởi hợp chất nêu trên và phân tử quan tâm nêu trên, hoặc của phân tử quan tâm nêu trên liên kết cộng hóa trị với hợp chất nêu trên (xem một số ví dụ về các thử nghiệm hoặc thí nghiệm như vậy được nêu dưới đây, tuy nhiên các phương pháp thử nghiệm không chỉ giới hạn ở, các ví dụ thử nghiệm dưới đây).

Cụ thể hơn, các thử nghiệm hoặc thí nghiệm này có thể được thực hiện bằng kỹ thuật phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (*Florescence-activated cell sorting - FACS*), miễn dịch huỳnh quang, đo tế bào theo dòng chảy, thẩm tách tây, đánh giá mức độ gây độc tế bào/mức độ kìm hãm tế bào, v.v..

Theo khía cạnh này, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp *in vitro* để điều chế phức hợp gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào có khả năng vận chuyển hợp chất gây độc tế bào vào trong tế bào động vật có vú, tốt hơn là tế bào sống, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- cho tác nhân gây độc tế bào liên kết cộng hóa trị với hợp chất:

- i) có khả năng gắn kết đặc hiệu với protein Axl, tốt hơn là protein Axl ở người, và

- ii) được nội hóa vào tế bào động vật có vú sau khi gắn kết với protein Axl này khi protein Axl này được biểu hiện trên bề mặt của tế bào động vật có vú.

Tốt hơn, nếu hợp chất nêu trên là hợp chất giống protein, tốt hơn nữa là kháng thể được định hướng đặc hiệu kháng protein Axl, hoặc kháng epitop của nó nằm trong miền EDC Axl, hoặc đoạn gắn kết chức năng của kháng thể này.

Theo phương án ưu tiên, tác nhân gây độc tế bào nêu trên được liên kết cộng hóa trị với kháng thể kháng Axl nêu trên hoặc đoạn chức năng của nó bằng phần tử liên kết, tốt hơn nữa là phần tử liên kết peptit, tốt hơn nữa là phần tử liên kết peptit có thể phân giải được, tốt hơn nữa là phần tử liên kết có thể được phân giải bởi, ví dụ, các hợp chất nội bào tự nhiên.

Giống như các thành viên khác trong họ TAM, miền ngoại bào (ECD) Axl có cấu tạo gần giống với cấu tạo của các phân tử bám dính tế bào. ECD Axl được đặc trưng bởi sự kết hợp của hai miền giống globulin miễn dịch được tiếp sau bởi hai miền liên kết giống fibronectin typ III [O'Bryan J.P. et al. Mol. Cell Biol. (1991).11, 5016-5031]. Hai miền giống globulin miễn dịch có đầu tận N là đủ để gắn kết phối tử Gas6 [Sasaki T. et al. EMBO J. (2006).25, 80-87].

Miền ngoại bào (extracellular domain-ECD) của protein Axl ở người là một đoạn gồm 451 axit amin, tương ứng với các axit amin 1-451 của trình tự SEQ ID NO. 29, trình tự này được thể hiện trong danh mục trình tự là trình tự SEQ ID NO. 31. Các axit amin 1-25 tương ứng với peptit tín hiệu, ECD của protein Axl ở người không có peptit tín hiệu tương ứng với các axit amin 26-451 của trình tự SEQ ID NO.29, được thể hiện trong danh mục trình tự là trình tự SEQ ID NO. 32.

Hiện nay, đã xác định được nhiều cách thức nội hóa khác nhau. Các cách thức này định hướng quá trình nội hóa các protein hoặc phức hợp protein vào tế bào. Sau khi nhập bào, hầu hết các protein màng hoặc lipid màng quay trở lại bề mặt tế bào (tái tuần hoàn), nhưng một số thành phần màng được vận chuyển đến thể nội bào muện hoặc thể Golgi [Maxfield F.R. & McGraw, T.E. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2004).5, 121-132].

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, i) gắn kết đặc hiệu với protein Axl ở người, và ii) được nội hóa sau khi gắn kết với protein Axl ở người nêu trên, trong đó protein gắn kết kháng nguyên này bao gồm ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa các trình tự SEQ ID NO. 1 đến 14, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với trình tự SEQ ID NO. 1 đến 14.

Theo phương án được ưu tiên nhất, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó,

i) gắn kết đặc hiệu với protein Axl ở người, tốt hơn là có trình tự SEQ ID NO. 29 hoặc 30 hoặc trình tự biến thể tự nhiên của nó, và

ii) được nội hóa sau khi gắn kết với protein Axl ở người nêu trên, protein gắn kết kháng nguyên này bao gồm ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa các trình tự SEQ ID NO. 1 đến 14.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đặc điểm và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ được thể hiện trong phần mô tả dưới đây qua các ví dụ và các hình vẽ, trong đó:

Fig.1: Thử nghiệm độc tính gây độc tế bào *in vitro* bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp tiếp hợp Mab-zap trên các tế bào SN12C.

Fig.2A, Fig.2B và Fig.2C: Tính đặc hiệu gắn kết của 1613F12 trên protein rhAxl-Fc cố định (2A), protein rhDtk-Fc (2B) hoặc rhMer-Fc (2C) bằng phân tích ELISA.

Fig.3: Phân tích FACS việc gắn kết 1613F12 trên các tế bào khối u người.

Fig.4: Phân tích ELISA trên protein rmAxl-Fc cố định (“rm” là chuột tái tổ hợp).

Fig.5: 1613F12 gắn kết trên các tế bào COS7 như được xác định bằng quy trình đánh dấu gián tiếp bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Fig.6: Thử nghiệm ELISA nghiên cứu gắn kết cạnh tranh với Gas6 bằng cách sử dụng 1613F12.

Fig.7: Phân tích gắn kết epitop bằng phương pháp thẩm tách tây bằng cách sử dụng dịch tan tế bào SN12C. NH (không nhiệt); NR (không khử); H (nhiệt); R (khử). Phát hiện GAPDH xác nhận sự nạp mẫu chuẩn trên gel.

Fig.8A và Fig.8B: Nghiên cứu quá trình điều hòa giảm Axl sau khi gắn kết 1613F12 trên các tế bào SN12C bằng phương pháp thẩm tách tây với Fig.8A – hình ảnh thẩm tách tây đại diện cho 3 thử nghiệm độc lập được tiến hành (phân tích thẩm tách tây được tiến hành sau khi ủ 1613F12 trên các tế bào SN12C 4 giờ và 24 giờ); và Fig. 8B- Định lượng mật độ quang màng có mặt bằng cách sử dụng phần mềm “QuantityOne”.

Fig.9A, Fig.9B và Fig.9C: Kính hiển vi miễn dịch huỳnh quang của các tế bào SN12C sau khi ủ với 1613F12. Fig.9A- ảnh chụp các điều kiện kiểm soát isotyp mIgG1 đối với cả việc nhuộm màng lẫn nội bào.

Fig.9B – Nhuộm màng. Fig.9C- Nhuộm nội bào cả thụ thể Axl bằng cách sử dụng 1613F12 lẫn phần tử đánh dấu endosom sớm EEA1. Các lớp phủ ảnh được thể hiện bên dưới và sự đồng định vị nhìn thấy được được thể hiện bằng các mũi tên.

Fig.10: Tác dụng của 1613F12 đến quá trình tăng sinh của tế bào SN12C *in vitro* so với tác dụng của kháng thể đối chứng isotyp mIgG1.

Fig.11A-Fig.11K: Thử nghiệm độc tính gây độc tế bào trực tiếp của thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin bằng cách sử dụng các dòng tế bào khối u người khác nhau. A- SN12C, B-Calu-1, C-A172, D-A431, E-DU145, F-MDA-MB435S, G-MDA-MB231, H-PC3, I-NCI-H226, J-NCI-H125, K-Panc1.

Fig.12: Thử nghiệm ELISA nghiên cứu gắn kết trên protein rhAxl-Fc của cả kháng thể m1613F12 lẫn hz1613F12.

Fig.13: So sánh gắn kết của các kháng thể 1613F12 chuột, khảm và được làm giống như của người trên các tế bào SN12C.

Fig.14: Thử nghiệm độc tính gây độc tế bào trực tiếp với sự có mặt của cả thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin chuột và được làm giống như của người lẫn các đối chứng isotyp sử dụng dòng tế bào khối u thận người SN12C.

Fig.15: Thử nghiệm độc tính gây độc tế bào trực tiếp với sự có mặt của cả thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin chuột và được làm giống như của người lẫn các đối chứng isotyp sử dụng dòng tế bào caxinom phổi người Calu-1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “protein gắn kết” hoặc “protein gắn kết kháng nguyên” là chuỗi peptit có ái lực đặc hiệu hoặc chung với protein hoặc phân tử khác (thường được gọi là kháng nguyên). Các protein này được cho tiếp xúc và tạo ra phức hợp sau khi gắn kết. Tốt hơn, nếu protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể, đoạn hoặc dẫn xuất của kháng thể, protein hoặc peptit.

Thuật ngữ “đoạn gắn kết kháng nguyên” của protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được dùng để chỉ peptit, polypeptit, hoặc protein bất kỳ giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với đích (thường được gọi là kháng nguyên) của protein gắn kết kháng nguyên, và bao gồm trình tự axit amin gồm ít nhất 5 gốc axit amin liền kề, ít nhất 10 gốc axit amin liền kề, ít nhất 15 gốc axit amin liền kề, ít nhất 20 gốc axit amin liền kề, ít nhất 25 gốc axit amin liền kề, ít nhất 40 gốc axit amin liền kề, ít nhất 50 gốc axit amin liền kề, ít nhất 60 gốc axit amin liền kề, ít nhất 70 gốc axit amin liền kề, ít nhất 80 gốc axit amin liền kề, ít nhất 90 gốc axit amin liền kề, ít nhất 100 gốc axit amin liền kề, ít nhất 125 gốc axit amin liền kề, ít nhất 150 gốc axit amin liền kề, ít nhất 175 gốc axit amin liền kề, ít nhất 200 gốc axit amin liền kề, hoặc ít nhất 250 gốc axit amin liền kề trong trình tự axit amin của protein gắn kết kháng nguyên.

Theo phương án ưu tiên, trong đó protein gắn kết kháng nguyên là kháng thể, “đoạn gắn kết kháng nguyên” như vậy được chọn từ nhóm bao gồm các đoạn Fv, scFv (sc đối với chuỗi đơn), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc hoặc các dạng tổ hợp khác nhau (diabodies), hoặc phân đoạn bất kỳ của nó, mà thời gian bán tồn có thể được tăng lên bằng cách cải biến hoá học, như bằng cách bổ sung poly(alkylen) glycol như poly(etylen) glycol (“PEG hóa”) (các đoạn peg hóa được gọi là Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG hoặc Fab'-PEG) (“PEG” đối với Poly(Etylen) Glycol), hoặc bằng cách kết hợp trong liposom, các đoạn này có ít nhất một CDR đặc thù của kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn là, “đoạn gắn kết kháng nguyên” nêu trên sẽ được cấu thành bởi hoặc sẽ bao gồm trình tự không hoàn chỉnh của chuỗi nặng hoặc nhẹ thay đổi của kháng thể mà từ đó thu được chúng, trình tự không hoàn chỉnh này là đủ để giữ cùng tính đặc hiệu gắn kết khi kháng thể mà từ đó nó được tạo ra và ái lực đủ, tốt hơn là ít nhất bằng 1/100, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 1/10 ái lực của kháng thể mà từ đó nó được tạo ra, so với đích. Đoạn chức năng như vậy sẽ chứa tối thiểu 5

axit amin, tốt hơn là 10, 15, 25, 50 và 100 axit amin liên tiếp của trình tự của kháng thể mà từ đó nó được tạo ra.

Thuật ngữ "epitop" là một vùng của kháng nguyên được gắn kết bởi protein gắn kết kháng nguyên, kể cả các kháng thể. Epitop có thể được xác định theo cấu trúc hoặc chức năng. Nói chung, epitop chức năng là nhóm phụ của epitop cấu trúc và có các gốc đóng góp một cách trực tiếp vào ái lực tương tác. Epitop cũng có thể có hình thể, tức là, bao gồm các axit amin không phải mạch thẳng. Theo một số phương án, epitop có thể bao gồm các yếu tố quyết định là các nhóm phân tử có bề mặt có hoạt tính hoá học như các axit amin, các mạch bên đường, nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl, và theo một số phương án, có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu, và/hoặc các đặc tính tích điện đặc hiệu.

Trong bản mô tả này, epitop nằm trong miền ngoại bào của protein Axl ở người.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong miền ngoại bào protein Axl ở người, tốt hơn là có trình tự SEQ ID NO. 31 hoặc 32 hoặc trình tự biến thể tự nhiên của nó.

Thuật ngữ “việc gắn kết đặc hiệu”, “gắn kết đặc hiệu”, hoặc các thuật ngữ tương tự, được dùng để chỉ protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, tạo ra phức hợp với kháng nguyên tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Việc gắn kết đặc hiệu có thể được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất khoảng 1.10^{-6} M hoặc nhỏ hơn. Các phương pháp xác định xem hai phân tử gắn kết đặc hiệu là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và các phương pháp tương tự. Để tránh hiểu lầm, điều này không có nghĩa là đoạn gắn kết kháng nguyên nêu trên không thể gắn kết hoặc gây nhiễu, ở mức độ thấp, với kháng nguyên khác. Tuy nhiên, theo phương án ưu tiên, đoạn gắn kết kháng nguyên nêu trên chỉ gắn kết với kháng nguyên nêu trên.

Trong bản mô tả này, “EC₅₀” dùng để chỉ nồng độ có hiệu quả 50%. Chính xác hơn, nồng độ có hiệu quả nửa tối đa (EC₅₀) tương ứng với nồng độ của thuốc, kháng thể hoặc chất gây độc gây ra đáp ứng nửa chừng giữa đường nền và mức tối đa sau khoảng thời gian tiếp xúc xác định. Nó thường được sử dụng như một phép đo hiệu lực của thuốc. Do đó, EC₅₀ của đường cong đáp ứng liều lượng phân loại biểu

diễn nồng độ của hợp chất mà 50% hiệu quả tối đa của nó được quan sát. EC_{50} của đường cong đáp ứng liều lượng hữu hạn biểu diễn nồng độ của hợp chất trong đó 50% quần thể có đáp ứng, sau khoảng thời gian tiếp xúc xác định. Việc đo nồng độ thông thường tuân theo đường cong xích ma, tăng nhanh khi nồng độ thay đổi tương đối ít. Điều này có thể được xác định theo phương pháp toán học bằng cách rút ra đường phù hợp nhất.

Theo phương án ưu tiên, EC_{50} được xác định trong sáng chế mô tả hiệu lực của kháng thể gắn kết trên ECD Axl tiếp xúc trên các tế bào khối u người. Thông số EC_{50} được xác định bằng phân tích FACS. Thông số EC_{50} phản ánh nồng độ kháng thể mà đạt được mức độ gắn kết tối đa 50% trên Axl người được biểu hiện trên các tế bào khối u người. Mỗi giá trị EC_{50} được tính toán là trung điểm của đường cong đáp ứng liều lượng sử dụng chương trình phù hợp đường cong hồi quy bốn tham số (phần mềm Prism). Thông số này được chọn để đại diện cho các tình trạng sinh lý/bệnh lý.

Theo một phương án của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, liên kết với epitop của nó có EC_{50} ít nhất bằng 10^{-9} M, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10^{-9} đến 10^{-12} M.

Phương án khác của sáng chế là quy trình hoặc phương pháp chọn lọc protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, có khả năng being nội hóa nội bào trong tế bào động vật có vú, tốt hơn là trong tế bào người, tốt hơn là tế bào sống, bao gồm các bước:

- i) chọn protein gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với Axl, tốt hơn là với miền EDC của nó hoặc với epitop của nó; và
- ii) chọn protein gắn kết kháng nguyên từ bước i) được nội hóa vào tế bào động vật có vú sau khi nó gắn kết với protein Axl được biểu hiện trên bề mặt của tế bào động vật có vú nêu trên.

Theo phương án cụ thể, tế bào động vật có vú nêu trên biểu hiện tự nhiên thụ thể protein Axl trên bề mặt của nó hoặc là các tế bào động vật có vú biểu hiện protein Axl tái tổ hợp trên bề mặt của nó, tốt hơn là người các tế bào.

Phương pháp hoặc quy trình như vậy có thể bao gồm các bước i) chọn protein gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với Axl có EC_{50} ít nhất bằng 10^{-9} M và ii) chọn protein gắn kết kháng nguyên từ bước trước đó được nội hóa sau khi nó gắn kết với Axl. Bước chọn lọc ii) có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ

đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để đánh giá khả năng nội hóa. Cụ thể hơn, các thử nghiệm có thể được thực hiện bằng kỹ thuật FACS, miễn dịch huỳnh quang, đo tế bào theo dòng chảy, thẩm tách tây, đánh giá mức độ gây độc tế bào, v.v..

Các đặc trưng khác của protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế là ở chỗ nó không có hoạt tính đáng kể bất kỳ đến quá trình tăng sinh của các tế bào khối u. Cụ thể hơn, như được minh họa trong các ví dụ sau, protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế không có hoạt tính *in vitro* đáng kể bất kỳ đến quá trình tăng sinh kiểu SN12C.

Trong ung thư, có nhiều cơ chế mà các mAb có thể phát huy hiệu quả điều trị, nhưng thường hoạt tính của họ là không đủ để tạo ra lợi ích lâu dài. Do đó, một số chiến lược đã được sử dụng để tăng cường hoạt tính của nó đặc biệt bằng cách kết hợp chúng với các hóa chất điều trị. Để làm phương pháp thay thế hiệu quả cho việc kết hợp này, độc tố miễn dịch trở thành một lựa chọn điều trị mới trong điều trị ung thư [Beck A. et al. *Discov. Med.* (2010).10, 329-339; Alley S.C. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2009).330, 932-938]. Thử tiếp hợp kháng thể-thuốc (ADC) là một cách tiếp cận mà khả năng để khai thác tính đặc hiệu mAb và định hướng việc vận chuyển tác nhân gây độc tế bào đến khối u có thể có thể nâng cao đáng kể cả mAb và hoạt tính của thuốc. Lý tưởng là, mAb sẽ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên có các biểu hiện đáng kể trên các tế bào khối u nhưng nhưng biểu hiện hạn chế trên các tế bào bình thường.

Sáng chế nhằm vào protein gắn kết kháng Axl đặc hiệu, và cụ thể hơn, vào kháng thể kháng Axl đặc hiệu, có khả năng cao để được nội hóa sau khi gắn kết Axl. Protein gắn kết kháng nguyên như vậy cũng đang được quan tâm như một trong số các hợp phần của thử tiếp hợp miễn dịch-thuốc, vì nó hướng chất gây độc tế bào được liên kết đến các tế bào ung thư đích. Khi được nội hóa, chất gây độc tế bào gây ra sự chết của tế bào ung thư.

Chìa khóa quan trọng để thành công với điều trị bằng thử tiếp hợp miễn dịch được cho là tính đặc hiệu kháng nguyên đích và quá trình nội hóa của các phức hợp protein gắn kết kháng nguyên trong các tế bào ung thư. Rõ ràng là các kháng nguyên không nội hóa ít hiệu quả hơn so với các kháng nguyên nội hóa vào việc vận chuyển chất gây độc tế bào. Các quá trình nội hóa có thể thay đổi phụ thuộc vào kháng nguyên và phụ thuộc vào nhiều thông số có thể bị ảnh hưởng bởi protein gắn kết.

RTK bề mặt tế bào tạo nên một họ kháng nguyên đáng quan tâm để nghiên cứu cách tiếp cận như vậy.

Trong phân tử sinh vật, chất gây độc tế bào mang hoạt tính gây độc tế bào và protein gắn kết kháng nguyên được sử dụng mang tính đặc hiệu của nó chống lại các tế bào ung thư, cũng như vector để đưa vào trong các tế bào để định hướng một cách chính xác chất gây độc tế bào.

Do vậy, để cải thiện phân tử thể tiếp hợp miễn dịch, protein gắn kết chất mang phải có khả năng cao để nội hóa vào các tế bào ung thư đích. Hiệu quả mà các protein gắn kết gây ra quá trình nội hóa là khác nhau phụ thuộc một cách đáng kể vào epitop được định hướng. Việc lựa chọn protein gắn kết kháng Axl nội hóa hiệu nghiệm đòi hỏi các dữ liệu thử nghiệm khác nhau nghiên cứu không chỉ quá trình điều hòa giảm Axl, mà còn quá trình sau đó protein gắn kết kháng Axl trở thành các tế bào.

Theo phương án ưu tiên, quá trình nội hóa protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được đánh giá tốt hơn là bằng cách phương pháp miễn dịch huỳnh quang (như được lấy làm ví dụ dưới đây trong bản mô tả này) hoặc phương pháp hoặc quy trình bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này về cơ chế nội hóa này.

Theo phương án ưu tiên khác, khi phức hợp Axl-protein gắn kết kháng nguyên, theo sáng chế, được nội hóa sau khi protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với ECD của Axl này, xảy ra sự giảm số lượng Axl trên bề mặt của các tế bào. Sự giảm này có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (thẩm tách tây, FACS, miễn dịch huỳnh quang, v.v..).

Theo một phương án của sáng chế, mức độ giảm này phản ánh quá trình nội hóa, tốt hơn nếu có thể đo được bằng FACS và được biểu hiện dưới dạng mức độ chênh lệch hoặc trị số delta giữa cường độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) được đo trên các tế bào không được xử lý với MFI được đo trên các tế bào được xử lý bằng protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế.

Để làm ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, trị số delta này được xác định dựa trên MFI thu được trên các tế bào không được xử lý và các tế bào được xử lý bằng protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế như được mô tả trong Ví dụ 9 bằng cách sử dụng i) các tế bào SN12C khối u thận ở người sau thời gian ủ 24 giờ

với protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế và ii) kháng thể thứ cấp được đánh dấu bằng Alexa488. Thông số này đã được xác định theo công thức sau:

$$\Delta (\text{MFI}_{24\text{h}} \text{ các tế bào không được xử lý} - \text{MFI}_{24\text{h}} \text{ các tế bào được xử lý bằng protein gắn kết kháng nguyên})$$

Sự chênh lệch này giữa các MFI phản ánh quá trình điều hòa giảm Axl khi MFI là các giá trị tỷ lệ của Axl được biểu hiện trên bề mặt tế bào.

Theo khía cạnh có lợi và được ưu tiên hơn, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng, tốt hơn là Mab phân lập, tạo ra trị số $\Delta (\text{MFI}_{24\text{h}} \text{ các tế bào không được xử lý} - \text{MFI}_{24\text{h}} \text{ các tế bào được xử lý})$ ít nhất bằng 200, tốt hơn là ít nhất bằng 300.

Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, làm giảm MFI ít nhất là 200.

Một cách chi tiết hơn, đenta nêu trên có thể được đo theo quy trình sau, quy trình này dùng để minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế:

- a) Xử lý và ủ các tế bào khối u quan tâm bằng protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế;
- b) Xử lý các tế bào được xử lý ở bước a) và, đồng thời, các tế bào không được xử lý bằng protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế,
- c) Đo MFI (đại diện cho số lượng của Axl present trên bề mặt) đối với các tế bào được xử lý và không được xử lý bằng kháng thể đã được đánh dấu thứ cấp có khả năng gắn kết với protein gắn kết kháng nguyên, và
- d) Tính toán trị số đenta là hiệu số của MFI thu được ở các tế bào được xử lý trừ đi MFI thu được ở các tế bào không được xử lý.

Các thuật ngữ "kháng thể", "các kháng thể" hoặc "globulin miễn dịch" được sử dụng thay cho nhau với nghĩa rộng nhất và bao gồm các kháng thể đơn dòng, tốt hơn là Mab được phân lập, (ví dụ, các kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ hoặc nguyên vẹn), các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa giá hoặc các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn).

Cụ thể hơn, phân tử như vậy chứa glycoprotein bao gồm ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi

nặng bao gồm vùng (hoặc miền) thay đổi chuỗi nặng (được gọi vắn tắt ở đây là HCVR hoặc VH) và vùng ổn định chuỗi nặng. Vùng ổn định chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi chuỗi nhẹ (được gọi vắn tắt ở đây là LCVR hoặc VL) và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Vùng ổn định chuỗi nhẹ bao gồm một miền CL. Các vùng VH và VL có thể còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định tính hỗ trợ (CDR), xen kẽ với các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo trình tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng thay đổi của chuỗi nặng và nhẹ chứa miền gắn kết tương tác với kháng nguyên. Vùng ổn định của các kháng thể có thể gây ra sự gắn kết globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố trên vật chủ, bao gồm các tế bào khác nhau trong hệ miễn dịch (ví dụ các tế bào tác động) và thành phần đầu tiên (Clq) trong hệ hỗ trợ cổ điển.

Các kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm một số đoạn kháng thể của nó. Các đoạn kháng thể nêu trên có tính đặc hiệu và ái lực gắn kết mong muốn, bất kể nguồn hoặc loại globulin miễn dịch (tức là, IgG, IgE, IgM, IgA, v.v...), tức là chúng có khả năng gắn kết đặc hiệu với protein Axl với ái lực tương đương với các kháng thể có chiều dài đầy đủ theo sáng chế.

Nói chung, để điều chế các kháng thể đơn dòng hoặc các đoạn chức năng của nó, nhất là có nguồn gốc từ chuột, có thể tham khảo kỹ thuật được mô tả một cách cụ thể trong sách hướng dẫn "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) hoặc kỹ thuật điều chế từ các tế bào lai được Kohler và Milstein mô tả (Nature, 256:495-497, 1975).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "Mab" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ phân tử kháng thể được định hướng kháng lại kháng nguyên đặc hiệu và có thể được tạo ra bởi một dòng vô tính của các tế bào B hoặc tế bào lai. Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được tái tổ hợp, tức là được sản xuất bằng cách tạo ra protein bằng kỹ thuật di truyền. Ngoài ra, trái với điều chế các kháng thể đa dòng thường bao gồm các kháng thể khác nhau được định hướng kháng lại các yếu tố quyết định, hoặc epitop khác nhau, thì mỗi kháng thể đơn dòng được định hướng kháng lại một epitop của kháng nguyên. Sáng chế đề cập đến các kháng thể được

phân lập hoặc thu được bằng cách tinh chế từ các nguồn tự nhiên hoặc thu được bằng cách tái tổ hợp di truyền hoặc tổng hợp hoá học.

Phương án ưu tiên của sáng chế là protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm hoặc chứa kháng thể, trong đó kháng thể này bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ chứa các trình tự SEQ ID NO. 1, 2 và 3, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với trình tự SEQ ID NO. 1, 2 và 3; và CDR ba chuỗi nặng chứa các trình tự SEQ ID NO. 4, 5 và 6, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 4, 5 và 6.

Theo phương án ưu tiên hơn của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa kháng thể, trong đó kháng thể này bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ chứa các trình tự SEQ ID NO. 1, 2 và 3; và ba CDR chuỗi nặng chứa các trình tự SEQ ID NO. 4, 5 và 6.

Theo khía cạnh được ưu tiên, các vùng CDR hoặc CDR được dùng để chỉ các vùng siêu biến của chuỗi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch như được xác định bằng IMGT. Trừ khi có quy định cụ thể, CDR sẽ được xác định trong bản mô tả này theo hệ thống đánh số IMGT.

Hệ thống đánh số đơn nhất IMGT được định nghĩa để so sánh các vùng thay đổi cho mọi thụ thể kháng nguyên, kiểu chuỗi, hoặc mọi loài [Lefranc M. -P., Immunology Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol, 27, 55-77 (2003)]. Theo hệ thống đánh số đơn nhất IMGT, các axit amin được bảo toàn thường có cùng vị trí, ví dụ, xystein 23 (1st-CYS), tryptophan 41 (CONSERVED-TRP), axit amin kỵ nước 89, xystein 104 (2nd-CYS), phenylalanin hoặc tryptophan 118 (J-PHE hoặc J-TRP). Hệ thống đánh số đơn nhất IMGT đưa ra sự phân định ranh giới đã quy chuẩn của vùng khung (FR1-IMGT: các vị trí từ 1 tới 26, FR2-IMGT: 39 tới 55, FR3-IMGT: 66 tới 104 và FR4-IMGT: 118 tới 128) và của vùng quyết định tính bổ trợ: CDRI-IMGT: 27 tới 38, CDR2-IMGT: 56 tới 65 và CDR3-IMGT: 105 tới 117. Do các khe hở thể hiện các vị trí bỏ trống, nên các độ dài CDR-IMGT (được thể hiện trong các dấu ngoặc và được cách bởi các dấu chấm, ví dụ như [8.8.13]) trở thành thông tin quan trọng. Hệ thống đánh số đơn nhất IMGT được sử dụng dưới dạng biểu thị đồ họa hai chiều, được ký hiệu là IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. và

Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], và dưới dạng biểu thị cấu trúc 3 chiều trong IMGT/3Dstructures-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. và Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Cần phải hiểu rằng, trong bản mô tả này, trừ khi có quy định cụ thể, các vùng xác định tính hỗ trợ hoặc CDR, được dùng để chỉ các vùng siêu biến của chuỗi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch như được xác định theo hệ thống đánh số IMGT.

Tuy nhiên, CDR cũng có thể được xác định theo hệ thống đánh số Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Có ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ. Trong bản mô tả này, các thuật ngữ "CDR" và "các CDR" được dùng để chỉ, tùy thuộc vào trường hợp, một hoặc nhiều, hoặc thậm chí tất cả, các vùng chứa phần lớn gốc axit amin chịu trách nhiệm về ái lực gắn kết của kháng thể với kháng nguyên hoặc epitop mà nó nhận biết.

Theo hệ thống đánh số Kabat, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm kháng thể, trong đó kháng thể này bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ, như được xác định theo hệ thống đánh số Kabat, chứa các trình tự SEQ ID NO. 9, 10 và 11, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 9, 10 và 11; và ba CDR chuỗi nặng, như được xác định theo hệ thống đánh số Kabat, chứa các trình tự SEQ ID NO. 12, 13 và 14, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với trình tự SEQ ID NO. 12, 13 và 14.

Trong nội dung của sáng chế, thuật ngữ "phần trăm độ giống" giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin để chỉ tỷ lệ phần trăm của các nucleotit hoặc các gốc axit amin giống hệt nhau giữa hai trình tự cần được so sánh, được tạo ra sau khi xếp thẳng hàng tối ưu, tỷ lệ phần trăm này hoàn toàn chỉ là số thống kê và sự khác nhau giữa hai trình tự được phân bố một cách ngẫu nhiên dọc theo chiều dài của chúng. Sự so sánh giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin được tiến hành thông thường bằng cách so sánh các trình tự sau khi xếp thẳng hàng một cách tối ưu chúng, sự so sánh này có thể được thực hiện theo kiểu từng đoạn hoặc bằng cách sử dụng "cửa sổ xếp thẳng hàng". Ngoài ra việc so sánh thủ công, sự xếp thẳng hàng tối ưu các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, bằng thuật toán thấu xạ cục bộ của Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], bằng thuật toán thấu xạ cục bộ của Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], bằng phương pháp tra cứu

tính đồng dạng của Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] hoặc bằng phần mềm máy tính bằng cách sử dụng các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA và TFASTA trong tài liệu the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, hoặc bằng phần mềm so sánh BLAST NR hoặc BLAST P).

Phần trăm độ giống giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin được xác định bằng cách so sánh hai trình tự đã xếp thẳng hàng tối ưu trong đó trình tự axit nucleic hoặc axit amin để so sánh có thể có các đoạn bổ sung hoặc các khuyết đoạn so với trình tự đối chứng để xếp thẳng hàng tối ưu giữa hai trình tự. Phần trăm độ giống được tính toán bằng cách xác định số lượng các vị trí mà ở đó nucleotit hoặc gốc axit amin là giống hệt nhau giữa hai trình tự, tốt hơn là giữa hai trình tự hoàn chỉnh, chia số lượng các vị trí giống hệt nhau cho tổng số các vị trí trong cửa sổ xếp thẳng hàng và nhân kết quả với 100 để thu được phần trăm độ giống giữa hai trình tự.

Ví dụ, chương trình BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein và nucleotit sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250) có bán trên trang web:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, có thể được sử dụng cùng với các thông số mặc định (đặc biệt là đối với các thông số "open gap penalty": 5, và "extension gap penalty": 2; nên được chọn ví dụ là nền "BLOSUM 62" được đề xuất bởi chương trình này); phần trăm độ giống giữa hai trình tự để so sánh được tính toán trực tiếp bởi chương trình này.

Đối với trình tự axit amin biểu hiện độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với trình tự axit amin đối chứng, các ví dụ được ưu tiên chứa các trình tự chứa trình tự đối chứng, một vài cải biến, đặc biệt là đoạn khuyết, đoạn bổ sung hoặc đoạn thay thế của ít nhất một axit amin, phần cụt hoặc nhô ra. Trong trường hợp thay thế một hoặc nhiều axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp, các phần tử thế được ưu tiên trong đó các axit amin được thế được thay thế bởi các axit amin "tương đương". Trong bản mô tả này, thuật ngữ "axit amin tương đương" để chỉ các axit amin bất kỳ kiểu như được thế cho một trong số các axit amin cấu trúc nhưng không làm cải biến các hoạt tính sinh học của các kháng thể tương ứng và của các ví dụ tính đặc hiệu được xác định dưới đây.

Các axit amin tương đương có thể được xác định hoặc là dựa theo độ giống cấu trúc với các axit amin mà chúng được thế hoặc là dựa theo các kết quả của các

thử nghiệm so sánh hoạt tính sinh học giữa các protein gắn kết kháng nguyên khác nhau có thể tạo ra được.

Trong số các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn, Bảng 1 ở dưới tóm tắt các thay thế có thể thực hiện được mà không dẫn tới kết quả làm cải biến một cách đáng kể về hoạt tính sinh học của protein gắn kết kháng nguyên được cải biến một cách tương ứng; các thay thế ngược có thể có trong tự nhiên dưới các điều kiện tương tự.

Bảng 2

Gốc ban đầu	(Các) Phần tử thế
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 7; và ba CDR chuỗi nặng chứa các trình tự SEQ ID

NO. 4, 5 và 6, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 4, 5 và 6.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO.7; và ba CDR chuỗi nặng chứa các trình tự SEQ ID NO. 4, 5 và 6.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO.7.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ chứa các trình tự SEQ ID NO. 1, 2 và 3, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO.1, 2 và 3; và miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 8.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ chứa các trình tự SEQ ID NO. 1, 2 và 3; và miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO.8.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO.8.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 7; và miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 8.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO. 7 và miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO. 8.

Nhằm làm rõ hơn, bảng 3a dưới đây tóm tắt các trình tự axit amin khác nhau tương ứng với protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế (với Mu. là chữ viết tắt cho chuột).

Bảng 3a

	Đánh số CDR	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO.
1613F12	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	11
		CDR-H1		12
		CDR-H2		13
		CDR-H3		14
			Miền thay đổi Mu.	7
		Miền thay đổi Mu.		8

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể chuột, hoặc các hợp chất thu được của nó hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ, kháng thể này cũng chứa các vùng ổn định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể của các loài khác với loài chuột, đặc biệt là người.

Theo khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể khảm, hoặc các hợp chất thu được của nó hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ kháng thể này cũng chứa các vùng ổn định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể của các loài khác với loài chuột, đặc biệt là người.

Theo khía cạnh cụ thể khác nữa, sáng chế đề cập đến kháng thể được làm giống như của người, hoặc các hợp chất thu được của nó hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu

được từ kháng thể người lần lượt là vùng lambda hoặc kappa và vùng gama-1, gama-2 hoặc gama-4.

Khía cạnh khác của sáng chế là protein gắn kết kháng nguyên chứa kháng thể đơn dòng 1613F12 thu được từ tế bào lai I-4505 được lưu giữ tại Trung tâm sưu tập giống nuôi cấy vi sinh vật quốc gia (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - CNCM), Viện Pasteur, Pháp, vào ngày 28 tháng bảy năm 2011, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào lai chuột có khả năng tiết protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế, đặc biệt là tế bào lai có nguồn gốc từ chuột được nộp tại Trung tâm sưu tập giống nuôi cấy vi sinh vật quốc gia (CNCM, Viện Pasteur, Paris, Pháp) vào ngày 28 tháng bảy năm 2011, với số I-4505. Tế bào lai này thu được bằng cách dung hợp các tế bào lách/các tế bào lympho của chuột đã được gây miễn dịch bằng Balb/C và các tế bào của dòng tế bào u tuỷ Sp 2/O-Ag 14.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào lai chuột có khả năng tiết kháng thể bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ chứa các trình tự SEQ ID NO. 1, 2 và 3; và ba CDR chuỗi nặng chứa các trình tự SEQ ID NO. 4, 5 và 6, tế bào lai này được nộp ở CNCM, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 28 tháng bảy năm 2011, với số I-4505. Tế bào lai này thu được bằng cách dung hợp các tế bào lách/các tế bào lympho của chuột đã được gây miễn dịch bằng Balb/C và các tế bào của dòng tế bào u tuỷ Sp 2/O-Ag 14.

Đối tượng của sáng chế là tế bào lai I-4505 ở chuột được lưu giữ tại CNCM, Viện Pasteur, Pháp, vào ngày 28 tháng bảy năm 2011.

Protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể khảm hoặc được làm giống như của người.

Kháng thể khảm là kháng thể chứa vùng thay đổi tự nhiên (chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) thu được từ kháng thể của các loài đã cho kết hợp với vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể của các loài khác loài với các loài đã cho này.

Các kháng thể, hoặc đoạn khảm của nó, có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp. Ví dụ, kháng thể khảm có thể được tạo ra bằng cách tách dòng ADN tái tổ hợp chứa gen khởi đầu và trình tự mã hoá của vùng thay đổi của kháng thể đơn dòng không phải ở người theo sáng chế, đặc biệt là chuột, và trình tự mã hoá của vùng ổn định của kháng thể người. Kháng thể khảm theo sáng chế được mã hóa bởi gen tái tổ hợp như vậy có thể, ví dụ, thể khảm chuột-người, tính đặc hiệu của

kháng thể này được xác định bởi vùng thay đổi thu được từ ADN chuột và isotyp của nó được xác định bởi vùng ổn định thu được từ người ADN. Tham khảo tài liệu: Verhoeyn *et al.* (BioEssays, 8:74, 1988) về các phương pháp điều chế các kháng thể ghép.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả protetin gắn kết chứa kháng thể khảm.

Theo phương án ưu tiên cụ thể, kháng thể khảm, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO. 7, và nó bao gồm trình tự miền thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO. 8.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả protetin gắn kết chứa kháng thể được làm giống như của người.

“Kháng thể được làm giống như của người” được dùng để chỉ kháng thể chứa các vùng CDR thu được từ kháng thể có nguồn gốc không phải từ người, các phần khác của phân tử kháng thể thu được từ một (hoặc một số) kháng thể của người. Ngoài ra, một số gốc của đoạn khung (được gọi là FR) có thể được cải biến để bảo toàn ái lực gắn kết (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327, 1988).

Các kháng thể được làm giống như của người theo sáng chế hoặc đoạn của nó có thể được bào chế bằng kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (như, ví dụ, các kháng thể đã được mô tả trong bài báo: Singer *et al.*, J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992; và Bebbington *et al.*, Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Các kháng thể được làm giống như của người như vậy là được ưu tiên để sử dụng trong các phương pháp bao gồm chẩn đoán hoặc phòng ngừa *in vitro* và/hoặc điều trị *in vivo*.

Kỹ thuật làm giống như của người khác, cũng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như, ví dụ, kỹ thuật “ghép CDR” đã được mô tả bởi PDL trong các patent: EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 hoặc US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 và US 5,693,761. Các patent Mỹ số 5,639,641 hoặc 6,054,297, 5,886,152 và 5,877,293 cũng có thể được kể đến.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể được làm giống như của người thu được từ các kháng thể chuột nêu trên.

Theo phương án ưu tiên, vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể người lần lượt là các vùng lambda hoặc kappa và gama-1, gama-2 hoặc gama-4.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên chứa kháng thể được làm giống như của người, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO. 36, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 36; và ba CDR chuỗi nặng chứa các trình tự SEQ ID NO. 4, 5 và 6.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ nhóm chứa các trình tự SEQ ID NO. 37 đến 47, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 37 đến 47; và ba CDR chuỗi nặng chứa các trình tự SEQ ID NO. 4, 5 và 6.

Thuật ngữ “trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 36 hoặc 37 đến 47”, được dự định dùng để chỉ các trình tự có ba CDR chuỗi nhẹ SEQ ID NO. 1, 2 và 3 và, ngoài ra, có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với các trình tự đầy đủ SEQ ID NO. 36 hoặc 37 đến 47 ngoài các trình tự tương ứng với các CDR (tức là SEQ ID NO. 1, 2 và 3).

Nhằm làm rõ hơn, bảng 3b dưới đây tóm tắt các trình tự axit amin khác nhau tương ứng với chuỗi nhẹ (VL) protein gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người theo sáng chế (với Hz. = được làm giống như của người)

Bảng 3b

Hz1613F12 VL	Phiên bản	SEQ ID NO.
	liên ứng	36
	VL1	37
	VL1 I2V	38
	VL1 M4I	39
	VL2.1	40
	VL2.1 V49T	41
	VL2.1 P50N	42
	VL2.2	43

	VL2.2 V49T	44
	VL2.2 P50N	45
	VL2.3	46
	VL3	47

Theo một phương án của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm:

- i) miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO.7,
- ii) miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 36 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO. 36; và
- iii) miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 37 đến 47 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO. 37 đến 47.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên chứa kháng thể được làm giống như của người, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên, chứa miền thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO. 48, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 48; và ba CDR chuỗi nhẹ chứa các trình tự SEQ ID NO. 1, 2 và 3.

Khác phương án của sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ nhóm chứa các trình tự SEQ ID NO. 49 đến 68, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 49 đến 68; và ba CDR chuỗi nhẹ chứa các trình tự SEQ ID NO. 1, 2 và 3.

Thuật ngữ “trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 48 và 49 đến 68”, được dự định dùng để chỉ các trình tự có ba CDR chuỗi nặng SEQ ID NO. 4, 5 và 6 và, ngoài ra, có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với trình tự đầy đủ SEQ ID NO. 48 và 49 đến 68 ngoài các trình tự tương ứng với các CDR (tức là. SEQ ID NO. 4, 5 và 6).

Nhằm làm rõ hơn, bảng 3c dưới đây tóm tắt các trình tự axit amin khác nhau tương ứng với chuỗi nặng (VH) của protein gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người theo sáng chế (với Hz. = được làm giống như của người).

Bảng 3c

Hz1613F12 VH	Phiên bản	SEQ ID NO.
	liên ứng	48
	VH1	49
	VH1 M39I	50
	VH1 W55R N66K	51
	VH1 I84S	52
	VH1 S85N	53
	VH1 I84N S85N	54
	VH2.1	55
	VH2.1 Q3H	56
	VH2.1 W55R	57
	VH2.1 N66K	58
	VH2.1 W55R N66K	59
	VH2.1 R80S	60
	VH2.1 N66K R80S	61
	VH2.2	62
	VH2.2 M89L	63
	VH2.3	64
	VH2.3 W55R	65
	VH2.3 Q3H W55R	66
	VH2.4	67
	VH3	68

Theo một phương án của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm:

- i) miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO.8;
- ii) miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 48 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO. 48; và

iii) miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 49 đến 68 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với SEQ ID NO. 49 đến 68.

Theo một phương án của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 36, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 36; và miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 48, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 48.

Theo phương án khác của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ nhóm chứa các trình tự SEQ ID NO. 37 đến 47, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 37 đến 47; và miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ nhóm chứa các trình tự SEQ ID NO. 49 đến 68, hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với SEQ ID NO. 49 đến 68.

Theo một phương án của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm:

i) miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7, 36 hoặc 37 đến 47 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với các trình tự SEQ ID NO. 7, 36 hoặc 37 đến 47; và

ii) miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8, 48 hoặc 49 đến 68 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống ít nhất là 80% với các trình tự SEQ ID NO. 8, 48 hoặc 49 đến 68.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic phân lập khác biệt ở chỗ axit này được chọn trong số các axit nucleic sau (bao gồm mã di truyền thoái hóa bất kỳ):

a) axit nucleic mã hoá protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế;

b) axit nucleic bao gồm:

- trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm chứa các trình tự SEQ ID NO. 15 đến 28 và 69 đến 99, hoặc

- trình tự axit nucleic bao gồm 6 trình tự axit nucleic SEQ ID NO.: 15 đến 20, hoặc

- trình tự axit nucleic bao gồm hai trình tự axit nucleic SEQ ID NO.: 21, 22, hoặc hai trình tự axit nucleic được chọn từ một phần từ SEQ ID NO.: 69 đến 79 và phần còn lại từ SEQ ID NO. : 80 to 99;

c) axit nucleic bổ trợ cho axit nucleic như được xác định ở mục a) hoặc b); và

d) axit nucleic, tốt hơn là có ít nhất 18 nucleotit, có khả năng lai hóa trong các điều kiện rất nghiêm ngặt với trình tự axit nucleic như được xác định trong phần a) hoặc b), hoặc với trình tự có độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% sau khi xếp thẳng hàng tối ưu với trình tự axit nucleic như được xác định trong phần a) hoặc b).

Bảng 4a dưới đây tóm tắt các trình tự nucleotit khác nhau liên quan đến protein gắn kết theo sáng chế (với Mu. = Chuột).

Bảng 4a

	Đánh số CDR	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO.
1613F12	IMGT		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		18
		CDR-H2		19
		CDR-H3		20
	Kabat		CDR-L1	23
			CDR-L2	24
			CDR-L3	25
		CDR-H1		26
		CDR-H2		27
		CDR-H3		28
			Miền thay đổi Mu.	21
		Miền thay đổi Mu.		22

Nhằm làm rõ hơn, bảng 4b dưới đây tóm tắt các trình tự nucleotit khác nhau tương ứng với chuỗi nhẹ (VL) protein gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người theo sáng chế (với Hz. = được làm giống như của người).

Bảng 4b

Hz1613F12 VL	Phiên bản	SEQ ID NO.
	VL1	69
	VL1 I2V	70
	VL1 M4I	71
	VL2.1	72
	VL2.1 V49T	73
	VL2.1 P50N	74
	VL2.2	75
	VL2.2 V49T	76
	VL2.2 P50N	77
	VL2.3	78
	VL3	79

Nhằm làm rõ hơn, bảng 4c dưới đây tóm tắt các trình tự nucleotit khác nhau tương ứng với chuỗi nặng (VH) protein gắn kết kháng nguyên được làm giống như của người theo sáng chế (với Hz. = được làm giống như của người).

Bảng 4c

	Phiên bản	SEQ ID NO.
	VH1	80
	VH1 M39I	81
	VH1 W55R N66K	82
	VH1 I84S	83
	VH1 S85N	84
	VH1 I84N S85N	85
	VH2.1	86
	VH2.1 Q3H	87

Hz1613F12 VH	VH2.1 W55R	88
	VH2.1 N66K	89
	VH2.1 W55R N66K	90
	VH2.1 R80S	91
	VH2.1 N66K R80S	92
	VH2.2	93
	VH2.2 M89L	94
	VH2.3	95
	VH2.3 W55R	96
	VH2.3 Q3H W55R	97
	VH2.4	98
	VH3	99

Các thuật ngữ “axit nucleic”, “trình tự nucleic”, “trình tự axit nucleic”, “polynucleotit”, “oligonucleotit”, “trình tự polynucleotit” và “trình tự nucleotit”, được sử dụng thay cho nhau trong bản mô tả này, được dùng để chỉ trình tự cụ thể của nucleotit, được cải biến hoặc không được cải biến, xác định đoạn hoặc vùng của axit nucleic, chứa hoặc không chứa nucleotit không có trong tự nhiên, và là AND sợi kép, ADN sợi đơn hoặc các sản phẩm phiên mã của ADN này.

Các trình tự theo sáng chế được phân lập và/hoặc tinh chế, tức là chúng được lấy mẫu một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, ví dụ bằng cách sao chép, môi trường của chúng được cải biến ít nhất một phần. Các axit nucleic phân lập thu được bằng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp, bằng phương tiện, ví dụ, các tế bào vật chủ, hoặc thu được bằng cách tổng hợp hoá học cũng được đề cập trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “các trình tự nucleic có phần trăm độ giống ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98%, sau khi xếp thẳng hàng tối ưu với một trình tự được ưu tiên” để chỉ các trình tự nucleic, ứng với một trình tự nucleic tham chiếu, có một vài cải biến như, cụ thể là, đoạn khuyết, phần cắt, phần nhô ra, dung hợp thể khảm và/hoặc phần tử thể, đặc biệt là lổm đóm. Tốt hơn là, chúng là các trình tự mà chúng mã hóa cho các trình tự axit amin giống như trình tự đối chứng, điều này liên quan tới sự thoái biến của mã di truyền, hoặc các trình tự bổ trợ có thể lai hóa đặc thù cùng với các trình tự đối chứng, tốt hơn là dưới các điều kiện rất nghiêm ngặt, đặc biệt là như được xác định ở dưới.

Quá trình lai hóa dưới các điều kiện rất nghiêm ngặt để chỉ rằng các điều kiện liên quan tới nhiệt độ và cường độ ion được chọn lọc để sao cho chúng cho phép sự lai hóa được duy trì giữa hai đoạn ADN bổ trợ. Chỉ nhằm mục đích minh họa, các điều kiện rất nghiêm ngặt của bước lai hóa nhằm mục đích xác định các đoạn polynucleotit nêu trên là có lợi như dưới đây.

Sự lai hóa ADN-ADN hoặc ADN-ARN được tiến hành trong hai bước: (1) tiền lai hóa ở 42°C trong ba giờ trong chất đệm phosphat (20mM, độ pH = 7,5) chứa 5X SSC (IX SSC tương ứng với dung dịch gồm 0,15M NaCl + 0,015M natri xitrat), 50% formamit, 7% natri đodexyl sulfat (SDS), 10X Denhardt, 5% dextran sulfat và 1% ADN tinh cá hồi; (2) lai hóa trong 20 giờ ở nhiệt độ tùy thuộc vào độ dài của đoạn dò (tức là: 42°C đối với đoạn dò có độ dài >100 nucleotit) được tiếp sau bởi hai lần rửa 20 phút ở 20°C trong 2X SSC + 2% SDS, một lần rửa 20 phút ở 20°C trong 0,1X SSC + 0.1% SDS. Lần rửa cuối được tiến hành trong 0,1X SSC + 0,1% SDS trong 30 phút ở 60°C đối với đoạn dò có độ dài >100 nucleotit. Các điều kiện lai hóa rất nghiêm ngặt nêu trên đối với một polynucleotit có kích cỡ đã xác định có thể được làm thích ứng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cho các oligonucleotit dài hơn hoặc ngắn hơn, theo các phương pháp được mô tả trong ấn phẩm: Sambrook, et al (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001).

Sáng chế cũng đề cập đến vector chứa axit nucleic như được mô tả trong sáng chế.

Sáng chế đặc biệt đề cập đến các vector tạo dòng vô tính và/hoặc biểu hiện chứa trình tự nucleotit như vậy.

Tốt hơn, nếu các vector theo sáng chế chứa các dấu hiệu mà nó cho phép biểu hiện và/hoặc tiết các trình tự nucleotit trong một tế bào chủ nhất định. Do vậy, vector này phải chứa gen khởi đầu, các tín hiệu khởi đầu và kết thúc dịch mã, cũng như các vùng điều hòa phiên mã thích hợp. Nó có thể phải được duy trì một cách thích hợp trong tế bào chủ và tùy ý có thể có các tín hiệu đặc hiệu đặc tả sự tiết của protein dịch mã. Các dấu hiệu khác nhau này được chọn lọc và được tối ưu hóa bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy thuộc vào tế bào chủ được sử dụng. Nhằm mục đích này, các trình tự nucleotit có thể được xen chính trong các vật chủ được chọn hoặc là các vật chủ tích hợp của các vật chủ được chọn.

Các vector như vậy được điều chế bằng các phương pháp thường được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và các dòng vô tính thu được có thể được đưa vào vật chủ thích hợp bằng các phương pháp tiêu

chuẩn như phương pháp lipofection (bọc vật liệu trong màng liposom), phương pháp đục lỗ bằng xung điện, các phương pháp sốc nhiệt hoặc các phương pháp hóa học.

Các vector gồm, ví dụ, các vector có nguồn gốc plasmid hoặc virus. Chúng thường được dùng để biến nạp các tế bào chủ để tạo dòng vô tính hoặc biểu hiện các trình tự nucleotit theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất các tế bào chủ được biến nạp bởi hoặc chứa vector như được mô tả trong sáng chế.

Tế bào chủ có thể được chọn trong số các hệ nhân rải rác hoặc nhân điển hình như các tế bào vi khuẩn, ví dụ, và cả các tế bào nấm men hoặc tế bào động vật, đặc biệt là tế bào động vật có vú (trừ người). Tế bào côn trùng hoặc thực vật tế bào cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến động vật, không phải người, có tế bào đã được biến nạp theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) nuôi cấy trong môi trường có các điều kiện nuôi cấy thích hợp đối với tế bào chủ theo sáng chế; và

b) thu hồi protein gắn kết kháng nguyên, hoặc một trong số các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, đã được tạo ra như vậy từ môi trường nuôi cấy hoặc từ các tế bào đã được nuôi cấy nêu trên.

Các tế bào đã biến nạp theo sáng chế được dùng trong các phương pháp để điều chế các protein gắn kết kháng nguyên tái tổ hợp theo sáng chế. Các phương pháp điều chế các protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế ở dạng tái tổ hợp, đặc trưng ở chỗ, các phương pháp này sử dụng vector và/hoặc tế bào được biến nạp bởi vector theo sáng chế, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Tốt hơn là, tế bào được biến nạp bởi vector theo sáng chế được nuôi cấy dưới các điều kiện cho phép sự biểu hiện của các protein gắn kết kháng nguyên nêu trên và thu hồi protein tái tổ hợp nêu trên.

Như nêu ở trên, tế bào chủ có thể được chọn trong số các hệ nhân rải rác hoặc nhân điển hình. Cụ thể là, có thể nhận diện các trình tự nucleotit theo sáng chế tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiết trong một hệ nhân rải rác hoặc nhân điển hình như vậy. Vật truyền theo sáng chế mang một trình tự như do đó có thể được sử dụng theo

cách có lợi để sản xuất các protein tái tổ hợp cần được tiết. Quả thực, việc tinh chế các protein tái tổ hợp được quan tâm này sẽ được tạo thuận lợi nhờ việc chúng có mặt trong dịch nổi bên trên của môi trường nuôi cấy tế bào thay vì nằm bên trong các tế bào chủ.

Các protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế cũng có thể được điều chế bằng cách tổng hợp hóa học. Một phương pháp điều chế như vậy cũng là một mục đích của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết các phương pháp để tổng hợp hóa học, như các kỹ thuật pha rắn (xem ấn phẩm: Steward *et al*, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., pp 71-95) hoặc các kỹ thuật pha rắn một phần, bằng cách trùng ngưng các đoạn hoặc bằng phương pháp tổng hợp thông thường trong dung dịch. Các polypeptit được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học và có khả năng chứa các axit amin không có trong tự nhiên tương ứng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế cũng được bao gồm trong sáng chế.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, như nêu trên để dùng làm chất định địa chỉ để vận chuyển tác nhân gây độc tế bào ở vị trí đích trên vật chủ, vị trí đích trên vật chủ nêu trên bao gồm epitop nằm trong miền ngoại bào protein Axl, tốt hơn là miền ngoại bào protein Axl ở người, tốt hơn nữa là miền ngoại bào protein Axl ở người có trình tự SEQ ID NO. 31 hoặc 32, hoặc trình tự biến thể tự nhiên của nó.

Theo phương án ưu tiên, vị trí đích trên vật chủ nêu trên là vị trí đích của tế bào động vật có vú, tốt hơn nữa là của tế bào người, tốt hơn nữa là các tế bào xuất hiện tự nhiên hoặc bằng cách tái tổ hợp di truyền, biểu hiện protein Axl.

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm protein gắn kết kháng nguyên như được mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp với tác nhân gây độc tế bào.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể tiếp hợp miễn dịch” hoặc “thể tiếp hợp-miễn dịch” nói chung được dùng để chỉ hợp chất chứa ít nhất chất định địa chỉ được liên kết vật lý với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu, do vậy tạo nên hợp chất được hướng đích ở mức độ cao.

Theo phương án ưu tiên, các tác nhân trị liệu như vậy bao gồm chất gây độc tế bào.

Thuật ngữ “tác nhân gây độc tế bào” hoặc “gây độc tế bào”, được dùng để chỉ tác nhân, khi được cung cấp cho đối tượng, có tác dụng điều trị hoặc ngăn ngừa sự phát triển của quá trình tăng sinh tế bào, tốt hơn là sự phát triển của bệnh ung thư trong cơ thể của đối tượng, bằng cách ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng tế bào và/hoặc gây chết tế bào.

Nhiều chất gây độc tế bào đã được phân lập hoặc được tổng hợp và để làm cho nó có thể ức chế quá trình tăng sinh của tế bào, hoặc phá hoại hoặc làm giảm, nếu không hoàn toàn, thì ít nhất cũng là đáng kể các tế bào khối u. Tuy nhiên, hoạt tính gây độc của các tác nhân này không chỉ giới hạn ở, các tế bào khối u, và các tế bào không phải là khối u cũng bị tác động và có thể bị phá hủy. Cụ thể hơn, các tác dụng phụ được quan sát trên các tế bào thay mới nhanh, như các tế bào tạo huyết hoặc các tế bào biểu mô, cụ thể ở các màng niêm dịch. Bằng cách minh họa, các tế bào thuộc dải dạ dày-ruột bị ảnh hưởng lớn do sử dụng chất gây độc tế bào như vậy.

Một trong những mục đích của sáng chế cũng nhằm đề xuất tác nhân gây độc tế bào cho phép có thể hạn chế các tác dụng phụ đến các tế bào bình thường trong khi đồng thời giữ được độc tính gây độc tế bào cao đối với các tế bào khối u.

Cụ thể hơn, tốt hơn nếu tác nhân gây độc tế bào có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thuốc (tức là “thể tiếp hợp kháng thể-thuốc”), độc tố (tức là “độc tố miễn dịch” hoặc “thể tiếp hợp kháng thể-độc tố”), đồng vị phóng xạ (tức là “thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ” hoặc “thể tiếp hợp kháng thể-đồng vị phóng xạ”), v.v..

Theo phương án ưu tiên thứ nhất của sáng chế, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm protein gắn kết được liên kết với ít nhất thuốc hoặc dược phẩm. Thể tiếp hợp miễn dịch như vậy được gọi là thể tiếp hợp kháng thể-thuốc (hoặc “ADC”) khi protein gắn kết là kháng thể, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo phương án thứ nhất, thuốc như vậy có thể được mô tả theo kiểu tác dụng của nó. Để làm ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, có thể kể đến chất alkyl hóa như mù tạc nitơ, alkyl-sulfonat, nitrosoure, oxazophorin, aziridin hoặc imin-etylen, chất chống chuyển hoá, chất kháng sinh kháng khối u, chất ức chế giảm phân, chất ức chế chức năng nhiễm sắc, chất chống tạo mạch, kháng estrogen, kháng androgen, các tác nhân chelat hoá, chất kích thích hấp thụ iron, chất ức chế yyclooxyaza, chất ức chế phosphodiesteraza, chất ức chế ADN, chất ức chế tổng

hợp ADN, các chất kích thích chết theo chương trình, chất ức chế thymidylat, chất ức chế tế bào T, chất chủ vận interferon, chất ức chế Ribonucleosit triphosphat reductaza, chất ức chế aromataza, chất đối kháng thụ thể estrogen, chất ức chế tyrosin kinaza, chất ức chế chu trình tế bào, Taxan, chất ức chế Tubulin, chất ức chế tạo mạch, chất kích thích đại thực bào, chất đối kháng thụ thể Neurokinin, chất chủ vận thụ thể Cannabinoid, chất chủ vận thụ thể Dopamin, chất chủ vận yếu tố kích thích bạch cầu hạt, chất chủ vận thụ thể Erythropoietin, chất chủ vận thụ thể somatostatin, chất chủ vận LHRH, chất cảm ứng canxi, chất đối kháng thụ thể VEGF, chất đối kháng thụ thể interleukin, chất ức chế tế bào huỷ xương, các chất kích thích tạo gốc, chất đối kháng thụ thể endothelin, Vinca alkaloit, kháng hormon hoặc các chất điều biến miễn dịch hoặc thuốc mới khác bất kỳ đáp ứng được tiêu chuẩn hoạt tính gây độc tế bào hoặc độc tố.

Các thuốc là, ví dụ, được trích dẫn trong VIDAL 2010, ở trang dành cho các hợp chất thuộc cột ung thư và huyết học “Cytotoxics”, các hợp chất gây độc tế bào được trích dẫn trong tài liệu này, trong đơn này được xem như là chất gây độc tế bào ưu tiên.

Cụ thể hơn, các thuốc được ưu tiên theo sáng chế là, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thuốc sau: mecloetamin, clorambucol, melphalen, cloryđrat, pipobromen, prednimustin, disođic-phosphat, estramustin, xyclophosphamit, altretamin, trofosfamid, sulfofosfamid, ifosfamid, thiotepa, trietylenamin, altetamin, carmustin, streptozoxin, fotemustin, lomustin, busulfan, treosulfan, improsulfan, đacarbazin, cis-platin, oxaliplatin, lobaplatin, heptaplatin, miriplatin hydrat, carboplatin, metotrexat, pemetrexed, 5-floruraxil, floxuridin, 5-flodeoxyuridin, capexitabin, xytarabin, fludarabin, xytosin arabinosit, 6-mercaptopurin (6-MP), nelarabin, 6-thioguanin (6-TG), clodesoxyadenosin, 5-azaxytidin, gemxitabin, cladribin, deoxycoformyxin, tegafur, pentostatin, doxorubixin, daunorubixin, idarubixin, valrubixin, mitoxantron, dactinomycin, mithramycin, plicamycin, mitomycin C, bleomycin, procarbazin, paclitaxel, doxetaxel, vinblastin, vincristin, vindesin, vinorelbin, topotecan, irinotecan, etoposet, valrubixin, amrubixin hydroclorua, pirarubixin, elliptinium axetat, zorubixin, epirubixin, idarubixin và teniposet, razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastat, thalidomit, CDC 501, DMXAA, L-651582, squalamin, endostatin, SU5416, SU6668, interferon-alpha, EMD121974, interleukin-

12, IM862, angiostatin, tamoxifen, toremifen, raloxifen, droloxifen, iodoxifen, anastrozol, letrozol, exemestan, flutamit, nilutamit, spironolacton, xyproteron axetat, finasterit, ximitidin, bortezomit, Velcade, bicalutamit, xyproteron, flutamit, fulvestran, exemestan, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib, retinoit, rexinoit, metoxsalen, metylaminolevulinat, aldesleukin, OCT-43, denileukin diflitox, interleukin-2, tasonermin, lentinan, sizofilan, roquinimex, pidotimod, pegademaza, thymopentin, poly I:C, procodazol, Tic BCG, corynebacterium parvum, NOV-002, ukRAIN, levamisol, 1311-chTNT, H-101, xelmoleukin, interferon alfa2a, interferon alfa2b, interferon gamma1a, interleukin-2, mobenakin, Rexin-G, texeleukin, aclarubixin, actinomyxin, arglabin, asparaginaza, carzinophilin, crommyxin, daunomyxin, leucovorin, masoprocol, neocarzinostatin, peplomyxin, sarkomyxin, solamargin, trabectedin, streptozoxin, testosteron, kuncatechin, sincatechin, alitretinoin, belotecan hidroclorua, calusteron, dromostanolon, elliptinium axetat, ethinyl estradiol, etoposid, floxymesteron, formestane, fosfetrol, goserelin axetat, hexyl aminolevulinat, histrelin, hidroxyprogesteron, ixabepilon, leuprolit, medroxyprogesteron axetat, megestrol axetat, metilprednisolon, metiltestosteron, miltefosin, mitobronitol, nadrolon fenilpropionat, norethindron axetat, prednisolon, prednison, temsirolimus, testolacton, triamconolon, triptorelin, vapreotide axetat, zinostatin stimalamer, amsacrin, arsen trioxid, bisantren hidroclorua, clorambuxil, clortrianisen, cis-diammindicloplatin, xyclophosphamid, dietilstilbestrol, hexametylmelamin, hidroxyure, lenalidomit, lomidamin, meclotanamin, mitotan, nedaplatin, nimustin hidroclorua, pamidronat, pipobroman, porfimer natri, ranimustin, razoxan, semustin, sobuzoxan, mesilat, trietylenmelamin, axit zoledronic, camostat mesilat, fadrozol HCl, nafoxidin, aminoglutetimit, carmofur, clofarabin, xytosin arabinosit, dexitabin, doxifluridin, enoxitabin, fludarabn fosfat, fluraxil, ftorafur, uraxil mustard, abarelix, bexaroten, raltitrexed, tamibaroten, temozolomit, vorinostat, megastrol, clodronat dinatri, levamisol, ferumoxitol, sat isomaltosit, xelecoxib, ibudilast, bendamustin, altretamin, mitolactol, temsirolimus, pralatrexat, TS-1, dexitabin, bicalutamit, flutamit, letrozol, clodronat dinatri, degarelix, toremifen xitrat, histamin dihidroclorua, DW-166HC, nitracrin, dexitabin, irinotecan hidroclorua, amsacrin, romidepsin, tretinoin, cabazitaxel, vandetanib, lenalidomit, axit ibandronic, miltefosin, vitespen, mifamurtit, nadroparin, granisetron, ondansetron, tropisetron,

alizaprit, ramosetron, dolasetron mesilat, fosaprepitant dimeglumin, nabilon, aprepitant, dronabinol, TY-10721, lisuride hydro maleat, epixeram, defibrotit, dabigatran etexilat, filgrastim, pegfilgrastim, reditux, epoetin, molgramostim, oprelvekin, sipuleucel-T, M-Vax, axetyl L-carnitin, donepezil hydroclorua, axit 5-aminolevulinic, methyl aminolevulinat, xetrorelax axetat, icodextrin, leuprorelin, methylphenidat, octreotit, amlexanox, plerixafor, menatetrenon, anetol dithiolethion, doxercalxiferol, xinacalxet hydroclorua, alefaxept, romiplostim, thymoglobulin, thymalfasin, ubenimex, imiquimod, everolimus, sirolimus, H-101, lasofoxifen, trilostan, incadronat, gangliosit, pegaptanib octanatri, vertoporfirin, axit minodronic, axit zoledronic, gali nitrat, alendronat natri, etidronat dinatri, dinatri pamidronat, dutasterit, natri stibogluconat, armodafinil, dexrazoxan, amifostin, WF-10, temoporfirin, darbepoetin alfa, anxestim, sargramostim, palifermin, R-744, nepidermin, oprelvekin, denileukin diftotox, crisantaspase, buserelin, deslorelin, lanreotit, octreotit, pilocarpin, bosentan, calicheamixin, maytansinoit và xiclonicat.

Để biết đầy đủ hơn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tham khảo tài liệu: “Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique” và “traité de chimie thérapeutique, vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edition TEC & DOC, 2003”.

Theo phương án ưu tiên thứ hai của sáng chế, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm protein gắn kết được liên kết với ít nhất đồng vị phóng xạ. Thể tiếp hợp miễn dịch như vậy được gọi là thể tiếp hợp kháng thể-đồng vị phóng xạ (hoặc “ARC”) khi protein gắn kết là kháng thể, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

Để phá huỷ chọn lọc khối u, kháng thể có thể chứa nguyên tử có độ phóng xạ cao. Nhiều đồng vị phóng xạ sẵn có để tạo ra ARC như, nhưng không chỉ giới hạn ở, At²¹¹, C¹³, N¹⁵, O¹⁷, F¹⁹, I¹²³, I¹³¹, I¹²⁵, In¹¹¹, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, tc^{99m}, Bi²¹², P³², Pb²¹², các đồng vị phóng xạ của Lu, gadoli, mangan hoặc sắt.

Các phương pháp hoặc quy trình bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để hợp nhất đồng vị phóng xạ như vậy trong ARC (xem, ví dụ “Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”, Chatal, CRC Press 1989). Để làm ví dụ không mang tính giới hạn, tc^{99m} hoặc I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ và In¹¹¹ có thể được gắn vào qua gốc xystein. Y⁹⁰ có

thể được gắn vào qua gốc lysin. I^{123} có thể được gắn vào bằng cách sử dụng phương pháp IODOGEN (Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57).

Một số ví dụ có thể được kể đến để minh họa kiến thức của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực ARC như Zevalin[®] là ARC chứa kháng thể đơn dòng kháng CD20 và đồng vị phóng xạ In^{111} hoặc Y^{90} được gắn kết bằng phân tử liên kết-chất chelat thioure (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69); hoặc Mylotarg[®] chứa kháng thể kháng CD33 được liên kết với calicheamixin, (US 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). Gần đây hơn, cũng có thể kể đến ADC được gọi là Adcetris (tương ứng với Brentuximab vedotin) mà gần đây đã được FDA chấp nhận để điều trị u bạch huyết Hodgkin (*Nature*, vol. 476, pp380-381, 25 August 2011).

Theo phương án ưu tiên thứ ba của sáng chế, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm protein gắn kết được liên kết với ít nhất độc tố. Thể tiếp hợp miễn dịch như vậy được gọi là thể tiếp hợp kháng thể-độc tố (hoặc “ATC”) khi protein gắn kết là kháng thể, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

Các độc tố là các chất độc đặc hiệu và có hiệu quả được tạo ra từ các sinh vật sống. Chúng thường chứa mạch axit amin có trọng lượng phân tử có thể thay đổi trong khoảng từ hai trăm (peptit) đến một trăm nghìn (protein). Chúng cũng có thể là các hợp chất hữu cơ phân tử thấp. Các độc tố được tạo ra bởi nhiều sinh vật, ví dụ, vi khuẩn, nấm, tảo và thực vật. Nhiều chất trong số chúng là cực độc, có độc tính lớn gấp vài lần so với các tác nhân gây độc thần kinh.

Các độc tố được sử dụng trong ATC có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tất cả các loại độc tố có thể gây ra tác động gây độc tế bào bằng các cơ chế bao gồm gắn kết tubulin, gắn kết ADN, hoặc ức chế topoisomeraza.

Các độc tố có hoạt tính enzym và các đoạn của nó có thể được sử dụng bao gồm chuỗi diphtheria A, các đoạn có hoạt tính không gắn kết có độc tố diphtheria, chuỗi exotoxin A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modeccin A, alpha-sarcin, protein Aleurites fordii, protein dianthin, protein *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crotin, chất ức chế saponaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomyxin, enomyxin, và tricothexen.

Các độc tố phân tử nhỏ, như dolastatin, auristatin, trichothecene, và CC1065, và các dẫn xuất của các độc tố này có hoạt tính gây độc, cũng được dự định thuộc phạm vi của sáng chế. Dolastatin và auristatin đã cho thấy làm ảnh hưởng đến chức năng vi quản, quá trình thủy phân GTP, và quá trình phân chia nhân và tế bào và có hoạt tính điều trị ung thư và kháng nấm.

"Phân tử liên kết", "đơn vị liên kết", hoặc "liên kết" được dùng để chỉ gốc hoá học bao gồm liên kết cộng hóa trị hoặc mạch gồm các nguyên tử gắn kết theo kiểu cộng hóa trị protein gắn kết với ít nhất một tác nhân gây độc tế bào.

Phân tử liên kết có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều chất liên hợp protein hai nhóm chức như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai nhóm chức của imidoeste (như dimethyl adipimidat HCl), các este có hoạt tính (như disuccinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), dẫn xuất bis-điazo (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo có hoạt tính bis (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được đánh dấu Cacbon-14 (MX-DTPA) là chất chelat hoá được lấy làm ví dụ để liên hợp các tác nhân gây độc tế bào với hệ định vị. Các chất tạo liên kết ngang khác có thể là BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) có bán trên thị trường (ví dụ, ở Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., U.S.A.).

Phân tử liên kết có thể là phân tử liên kết "không phân giải được" hoặc "có thể phân giải được".

Theo phương án ưu tiên, nó là "phân tử liên kết có thể phân giải được" tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng tác nhân gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, phân tử liên kết không bền trong axit, phân tử liên kết nhạy peptidaza, phân tử liên kết không bền dưới ánh sáng, phân tử liên kết chứa nhóm dimetyl hoặc phân tử liên kết chứa nhóm disulfua có thể được sử dụng. Theo phương án ưu tiên, phân tử liên kết có thể phân giải được trong các điều kiện nội bào, sao cho sự phân giải của phân tử liên kết làm giải phóng tác nhân gây độc tế bào ra khỏi protein gắn kết trong môi trường nội bào.

Ví dụ, theo một số phương án, phần tử liên kết có thể phân giải được bằng chất phân giải có mặt trong môi trường nội bào (ví dụ, trong lysosom hoặc endosom hoặc caveolea). Phần tử liên kết có thể là, ví dụ, phần tử liên kết peptidyl được phân giải bởi enzym peptidaza hoặc proteaza nội bào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, proteaza lysosom hoặc endosom. Thông thường, phần tử liên kết peptidyl ít nhất có chiều dài gồm hai axit amin hoặc ít nhất ba axit amin. Chất phân giải có thể bao gồm các cathepsin B và D và plasmin, tất cả trong số chúng đều có tác dụng thủy phân các dẫn xuất thuốc dipeptit dẫn đến việc làm giải phóng thuốc có hoạt tính bên trong các tế bào đích. Ví dụ, phần tử liên kết peptidyl có thể phân giải được bởi proteaza cathepsin-B phụ thuộc thiol, được biểu hiện ở mức độ cao trong mô ung thư, có thể được sử dụng (ví dụ, phần tử liên kết Phe-Leu hoặc Gly-Phe-Leu-Gly). Theo các phương án cụ thể, phần tử liên kết peptidyl có thể phân giải được bởi proteaza nội bào là phần tử liên kết Val-Cit hoặc phần tử liên kết Phe-Lys. Một ưu điểm của việc sử dụng phân giải protein nội bào để giải phóng tác nhân gây độc tế bào là ở chỗ chất này thường suy yếu khi tiếp hợp và độ ổn định trong huyết thanh của thể tiếp hợp này thường cao.

Theo phương án khác, phần tử liên kết có thể phân giải được là nhạy với pH, tức là nhạy với quá trình thủy phân ở một số giá trị pH nhất định. Thông thường, phần tử liên kết nhạy với pH có thể thủy phân trong các điều kiện axit. Ví dụ, phần tử liên kết không bền trong axit có thể thủy phân trong lysosom (ví dụ, hydrazon, semicarbazon, thiosemicarbazon, cis-aconitic amit, orthoeste, axetal, ketal, hoặc các chất tương tự) có thể được sử dụng. Các phần tử liên kết như vậy là tương đối ổn định trong các điều kiện độ pH trung tính, như trong máu, nhưng không ổn định trong môi trường có độ pH dưới 5,5 hoặc 5,0, xấp xỉ độ pH của lysosom. Theo một số phương án, phần tử liên kết có thể thủy phân là phần tử liên kết thioete (như, ví dụ, thioete được gắn vào tác nhân trị liệu thông qua liên kết axylhydrazon).

Theo phương án khác, phần tử liên kết có thể phân giải được trong các điều kiện khử (ví dụ, phần tử liên kết disulfua). Nhiều phần tử liên kết disulfua là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, ví dụ, phần tử liên kết có thể được tạo thành bằng cách sử dụng SATA (N-succinimidyl-S-axetylthioaxetat), SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridylđithio)propionat), SPDB (N-succinimidyl-3-(2-pyridylđithio)butyrat) và SMPT (N-succinimidyl-oxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-pyridyl-đithio)toluen)-, SPDB và SMPT.

Để làm ví dụ không mang tính giới hạn về phần tử liên kết không phân giải được hoặc “không thể khử được”, có thể kể đến là thể tiếp hợp miễn dịch Trastuzumab-DM1 (TDM1) kết hợp trastuzumab với tác nhân hóa trị liệu được liên kết, maytansin (Cancer Research 2008; 68: (22). November 15, 2008).

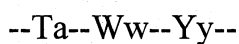
Theo phương án ưu tiên, thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này như, nhưng không chỉ giới hạn ở, i) cho nhóm ái nhân của protein gắn kết kháng nguyên phản ứng với phần tử liên kết hóa trị hai, tiếp đó là phản ứng với tác nhân gây độc tế bào hoặc ii) cho nhóm ái nhân của tác nhân gây độc tế bào phản ứng với phần tử liên kết hóa trị hai tiếp đó là phản ứng với nhóm ái nhân của protein gắn kết kháng nguyên.

Các nhóm ái nhân trên protein gắn kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm amin đầu tận N, nhóm amin mạch bên, ví dụ lysin, nhóm thiol mạch bên, và hydroxyl đường hoặc các nhóm amin khi protein gắn kết kháng nguyên được glycosyl hoá. Amin, thiol, và các nhóm hydroxyl là ái nhân và có khả năng phản ứng để tạo ra liên kết cộng hóa trị với các nhóm ưa điện tử trên gốc phần tử liên kết và phần tử liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các este có hoạt tính như các nhóm este NHS, các este HOBt, haloformat, và axit halogenua; alkyl và benzyl halogenua như haloaxetamid; các aldehyt, các keton, cacboxyl, và maleimit. Protein gắn kết kháng nguyên có thể disulfua giữa mạch khử được, tức là liên kết cầu xystein. Protein gắn kết kháng nguyên có thể được tạo khả năng phản ứng để liên hợp với phần tử liên kết bằng cách xử lý với chất khử như DTT (đithiotreitol). Do vậy, mỗi liên kết cầu xystein sẽ tạo ra, về mặt lý thuyết, hai ái nhân thiol dễ phản ứng. Các nhóm ái nhân bổ sung có thể được đưa vào protein gắn kết kháng nguyên thông qua phản ứng bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để làm ví dụ không mang tính giới hạn, các nhóm thiol dễ phản ứng có thể được đưa vào protein gắn kết kháng nguyên bằng cách đưa vào một hoặc nhiều gốc xystein.

Thể tiếp hợp miễn dịch cũng có thể được tạo ra bằng cách cải biến protein gắn kết kháng nguyên để đưa vào gốc ưa điện tử, gốc này có thể phản ứng với các phần tử ái nhân trên phần tử liên kết hoặc tác nhân gây độc tế bào. Các gốc đường của protein gắn kết kháng nguyên đã được glycosyl hoá có thể được oxy hóa để tạo ra các nhóm andehit hoặc keton có thể phản ứng với nhóm amin của phần tử liên kết

hoặc tác nhân gây độc tế bào. Các nhóm bazơ imin Schiff thu được có thể tạo ra liên kết ổn định, hoặc có thể được khử để tạo ra các liên kết amin ổn định. Theo một phương án, phản ứng của phần hydrat cacbon của protein gắn kết kháng nguyên đã được glycosyl hoá với galactosa oxidaza hoặc natri meta-periodat có thể tạo ra các nhóm carbonyl (andehit và keton) trong protein có thể phản ứng với các nhóm thích hợp trên thuốc. Theo phương án khác, các protein chứa các gốc serin hoặc threonin ở đầu tận cùng N có thể phản ứng với natri meta-periodat, để tạo ra andehit ở vị trí axit amin thứ nhất.

Theo một số phương án ưu tiên, đơn vị liên kết có thể có công thức tổng quát sau:



trong đó:

-T- là đơn vị kéo dài mạch;

a bằng 0 hoặc 1;

-W- là đơn vị axit amin;

w độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 12;

-Y- là đơn vị đệm;

y bằng 0, 1 hoặc 2.

Đơn vị kéo dài mạch (-T-), khi có mặt, liên kết protein gắn kết kháng nguyên với đơn vị axit amin (-W-). Các nhóm chức hữu ích có thể có mặt trên protein gắn kết kháng nguyên, hoặc là một cách tự nhiên hoặc bằng phương pháp hoá học, bao gồm nhóm sulfhydryl, amin, hydroxyl, anome hydroxyl của hydrat cacbon, và cacboxyl. Các nhóm chức thích hợp là sulfhydryl và amino. Các nhóm sulfhydryl có thể được tạo ra bằng cách khử liên kết disulfua giữa các phân tử của protein gắn kết kháng nguyên, nếu có. Theo cách khác, các nhóm sulfhydryl có thể được tạo ra bằng cách cho nhóm amin của gốc lysin của protein gắn kết kháng nguyên phản ứng với 2-iminothiolan hoặc các chất tạo sulfhydryl khác. Theo các phương án cụ thể, protein gắn kết kháng nguyên là kháng thể tái tổ hợp và được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để mang một hoặc nhiều lysin. Tốt hơn nữa là, protein gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để mang một hoặc nhiều Cystein (xem ThioMabs).

Theo một số phương án cụ thể, đơn vị kéo dài mạch tạo ra liên kết với nguyên tử lưu huỳnh của protein gắn kết kháng nguyên. Nguyên tử lưu huỳnh này có thể thu được từ nhóm sulfhydryl ($--SH$) của protein gắn kết kháng nguyên đã được khử.

Theo một số các phương án cụ thể khác, đơn vị kéo dài mạch được liên kết với protein gắn kết kháng nguyên thông qua liên kết disulfua giữa nguyên tử lưu huỳnh của protein gắn kết kháng nguyên và nguyên tử lưu huỳnh của đơn vị kéo dài mạch.

Theo các phương án cụ thể khác, nhóm dễ phản ứng của đơn vị kéo dài mạch chứa vị trí dễ phản ứng có thể phản ứng với nhóm amin của protein gắn kết kháng nguyên. Nhóm amin có thể là nhóm amin của arginin hoặc lysin. Vị trí dễ phản ứng của amin thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các este hoạt hoá như các este suxinimit, các este 4-nitrophenyl, các este pentafluorophenyl, anhydrit, clorua axit, clorua sulfonyl, isoxyanat và isothioxyanat.

Theo khía cạnh khác, nhóm chức dễ phản ứng của đơn vị kéo dài mạch chứa vị trí dễ phản ứng phản ứng với nhóm hydrat cacbon đã được cải biến có thể có mặt trên protein gắn kết kháng nguyên. Theo phương án cụ thể, protein gắn kết kháng nguyên được glycosyl hoá bằng enzym để tạo ra gốc hydrat cacbon (lưu ý rằng, khi protein gắn kết kháng nguyên là kháng thể, thì kháng thể này nói chung được glycosyl hoá một cách tự nhiên). Hydrat cacbon có thể được oxy hóa ở mức nhẹ nhàng bằng chất phản ứng như natri periodat và đơn vị carbonyl thu được của hydrat cacbon đã được oxy hóa có thể được ngưng tụ với đơn vị kéo dài mạch chứa nhóm chức như hydrazit, oxim, amin dễ phản ứng, hydrazin, thiosemicarbazit, hydrazin cacboxylat, hoặc arylhydrazit.

Đơn vị axit amin ($-W-$) liên kết đơn vị kéo dài mạch ($-T-$) với đơn vị đệm ($-Y-$) nếu đơn vị đệm này có mặt, và liên kết đơn vị kéo dài mạch với tác nhân gây độc tế bào nếu đơn vị đệm này không có mặt.

Như nêu trên, $-Ww-$ có thể là đơn vị dipeptit, tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit, hexapeptit, heptapeptit, octapeptit, nonapeptit, decapeptit, undecapeptit hoặc dodecapeptit.

Theo một số phương án, đơn vị axit amin có thể bao gồm gốc axit amin như, nhưng không chỉ giới hạn ở, alanin, valin, loxin, isoloxin, metionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, lysin được bảo vệ bằng axetyl hoặc formyl, arginin, arginin được bảo vệ bằng các nhóm tosyl hoặc nitro, histidin, ornithin, ornithin được bảo vệ bằng

axetyl hoặc formyl và xitruilin. Các phần tử liên kết axit amin được lấy làm ví dụ bao gồm, tốt hơn là, dipeptit, tripeptit, tetrapeptit hoặc pentapeptit.

Các dipeptit được lấy làm ví dụ bao gồm: Val-Cit, Ala-Val, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-Nitro-Arg.

Các tripeptit được lấy làm ví dụ bao gồm: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys.

Tetrapeptit được lấy làm ví dụ bao gồm: Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO. 33), Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO. 34).

Pentapeptit được lấy làm ví dụ bao gồm: Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO. 35).

Gốc axit amin chứa phần tử liên kết axit amin bao gồm các gốc có trong tự nhiên, cũng như các axit amin nhỏ và các chất tương tự axit amin không có trong tự nhiên, như xitruilin. Phần tử liên kết axit amin có thể được tạo ra và được làm tối ưu hoá về khả năng chọn lọc của nó trong việc phân giải enzym bằng một enzym cụ thể, ví dụ, proteaza liên quan đến khối u, cathepsin B, C và D, hoặc plasmin proteaza.

Đơn vị axit amin của phần tử liên kết có thể được phân giải bằng enzym bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, proteaza liên quan đến khối u để giải phóng tác nhân gây độc tế bào.

Đơn vị axit amin có thể được tạo ra và được làm tối ưu hoá về khả năng chọn lọc của nó trong việc phân giải enzym bằng một proteaza liên quan đến khối u cụ thể. Đơn vị thích hợp là đơn vị có quá trình phân giải được xúc tác bằng proteaza, cathepsin B, C và D, và plasmin.

Đơn vị đệm (-Y-), khi có mặt, liên kết đơn vị axit amin với tác nhân gây độc tế bào. Đơn vị đệm có hai loại chung: tự hy sinh (self-immolative) và không tự hy sinh (non self-immolative). Đơn vị đệm không tự hy sinh là đơn vị trong đó một phần hoặc tất cả đơn vị đệm giữ được liên kết với tác nhân gây độc tế bào sau khi phân giải enzym đơn vị axit amin từ thể tiếp hợp miễn dịch. Ví dụ về đơn vị đệm không tự hy sinh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đơn vị đệm (glyxin-glyxin) và đơn vị đệm glyxin. Để giải phóng tác nhân gây độc tế bào, phản ứng thủy phân độc lập phải xảy ra trong tế bào để phân giải liên kết đơn vị glyxin-thuốc.

Theo phương án khác, đơn vị đệm không tự hy sinh (-Y-) là -Gly-.

Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch thiếu đơn vị đệm ($y=0$). Theo cách khác, thể tiếp hợp miễn dịch chứa đơn vị đệm tự hy sinh có thể giải phóng tác nhân gây độc tế bào mà không cần bước thủy phân riêng rẽ. Theo các phương án này, -Y- là đơn vị rượu p-aminobenzyl (PAB) liên kết với -Ww- thông qua nguyên tử nitơ trong nhóm PAB, và được nối một cách trực tiếp với -D thông qua nhóm cacbonat, carbamat hoặc etc.

Ví dụ về khác về các đơn vị đệm tự hy sinh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất thơm tương đương về mặt điện tử với nhóm PAB như các dẫn xuất 2-aminoimidazol-5-metanol và ortho hoặc para-aminobenzylaxetal. Các đơn vị đệm có thể được sử dụng mà đã trải qua phản ứng việc đóng mạch vòng dễ dàng khi thủy phân liên kết amit, như các amit của axit 4-aminobutyric được thể và không được thể, hệ vòng bixyclo[2.2.1] và bixyclo[2.2.2] được thể thích hợp và 2- các amit của axit aminophenylpropionic.

Theo một phương án khác, đơn vị đệm là đơn vị bis(hydroxymetyl)styren (BHMS) mạch nhánh, có thể được sử dụng để đưa chất gây độc tế bào bổ sung.

Cuối cùng, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch như nêu trên dùng để điều trị bệnh ung thư.

Tốt hơn, nếu các bệnh ung thư có thể được chọn thông qua các bệnh ung thư có liên quan đến Axl bao gồm các tế bào khối u biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức toàn bộ hoặc một phần của protein Axl trên bề mặt của nó.

Cụ thể hơn, các bệnh ung thư nêu trên là các bệnh ung thư vú, ruột kết, ung thư thực quản, tế bào gan, dạ dày, u thần kinh đệm, phổi, u melanin, bệnh sacôm xương, bệnh ung thư buồng trứng, tuyến tiền liệt, bệnh sacôm cơ vân, thận, tuyến giáp, nội mạc tử cung và các hiện tượng kháng thuốc bất kỳ. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm chứa thể tiếp hợp miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả này.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế với ít nhất tá được và/hoặc chất dẫn thuốc được dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất dẫn thuốc được dụng” hoặc “các tá được” được dùng để chỉ hợp chất hoặc hỗn hợp chứa các hợp chất khi đưa vào được phẩm không gây ra các phản ứng thứ cấp và cho phép, ví dụ, tạo điều kiện thuận lợi cho việc dùng hoạt chất, sự tăng thời gian tồn tại của nó và/hoặc hiệu quả của nó trong cơ thể, sự tăng độ tan của nó trong dung dịch hoặc cải thiện mức độ bảo toàn

của nó. Các chất dẫn thuốc được dụng và các tá được này là đã biết và sẽ được điều chỉnh bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo bản chất và kiểu dùng hoạt chất được chọn.

Tốt hơn, nếu các thể tiếp hợp miễn dịch này sẽ được cấp theo đường toàn thân, cụ thể theo đường tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong màng bụng hoặc dưới da, hoặc dùng qua đường miệng. Theo cách được ưu tiên hơn, chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế sẽ được cho dùng vài lần, theo cách tuần tự.

Kiểu dùng, liều lượng và dạng được phẩm tối ưu của chúng có thể được xác định theo các tiêu chuẩn nói chung có tính đến trong khi tiến hành điều trị được làm thích ứng với người bệnh, ví dụ như độ tuổi hoặc thể trọng của người bệnh, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý chung của người bệnh, sự dung nạp trong điều trị và các tác dụng thứ cấp cần chú ý.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong các ví dụ sau, thuật ngữ kháng thể 1613F12 hoặc kháng thể m1613F12 được dùng để chỉ kháng thể 1613F12 ở chuột. Dạng được làm giống như của người của kháng thể 1613F12 được gọi là hz1613F12.

Theo cách này, kháng thể đối chứng isotyp được sử dụng bao gồm IgG1 chuột được gọi là 9G4. Điều này có nghĩa là, trong các ví dụ sau, thuật ngữ đối chứng mIgG1 và 9G4 là tương tự.

Ví dụ 1: Nội hóa thụ thể Axl

Khi phương án thể tiếp hợp miễn dịch là có hiệu quả hơn khi kháng nguyên đích là protein nội hóa, nên việc nội hóa thụ thể Axl bằng cách sử dụng thử nghiệm độc tính gây độc tế bào Mab-Zap đến các dòng tế bào khối u người được nghiên cứu. Một cách chính xác hơn, chất phản ứng Mab-Zap là thể tiếp hợp hoá học bao gồm ái lực của IgG dẻ kháng chuột tinh chế và protein khử hoạt tính ribosom, saporin. Nếu quá trình nội hóa phức hợp miễn dịch xảy ra, saporin tách ra khỏi tác nhân hướng đích và khử hoạt tính ribosom, dẫn đến việc ức chế tổng hợp protein và, cuối cùng là, làm chết tế bào. Khả năng sống sót của tế bào được xác định sau 72 giờ ủ với 1613F12 hoặc kháng thể đối chứng isotyp mIgG1 trên các tế bào dương tính với Axl cho phép kết luận đối với quá trình nội hóa thụ thể Axl do 1613F12 gây ra.

Đối với ví dụ này, các tế bào dương tính mạnh với Axl, như được xác định bằng cách sử dụng chất phản ứng Qifikit (Dako) được sử dụng. Dữ liệu được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể thương phẩm MAB154 được xác định đối với các tế bào SN12C ung thư thận người	
RTK	AXL
Kháng thể Dòng tế bào	MAB154
SN12C	>100 000

Trong ví dụ sau các tế bào SN12C được sử dụng làm ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Dòng tế bào khác bất kỳ biểu hiện mức độ thích hợp thụ thể Axl trên bề mặt tế bào của nó có thể được sử dụng.

1613F12 hoặc kháng thể đối chứng isotyp mIgG1 với các nồng độ được ủ sơ bộ với 100ng kháng thể thứ cấp Mab-Zap (Hệ hướng đích cao cấp) trong môi trường nuôi cấy tế bào trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được nạp lên các tế bào SN12C hợp lưu phụ được đặt trong vi đĩa gồm các đĩa có 96 lỗ màu trắng. Các đĩa này được ủ trong thời gian 72 giờ ở nhiệt độ 37°C với sự có mặt của 5% CO₂. Khả năng sống sót của tế bào được xác định bằng cách sử dụng phương pháp tăng sinh tế bào Cell Titer Glo theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Promega). Một số mẫu đối chứng được tiến hành: i) không có thể tiếp hợp miễn dịch thứ cấp bất kỳ và ii) không có kháng thể sơ cấp. Đồng thời, các thử nghiệm được tiến hành với đối chứng isotyp mIgG1.

Các kết quả thu được được thể hiện trên Fig.1.

1613F12 thể hiện tác động gây độc tế bào tối đa trên các tế bào SN12C là ~36 %. Không có tác động gây độc tế bào nào được quan sát với sự có mặt của kháng thể 9G4, được coi là đối chứng isotyp mIgG1 trong thử nghiệm này. Không có độc tính gây độc tế bào nào được quan sát trong các lỗ chỉ chứa các kháng thể sơ cấp (dữ liệu không thể hiện). Do vậy, thụ thể Axl dường như là kháng nguyên thích hợp đối với đích cho phương án thể tiếp hợp miễn dịch khi phức hợp miễn dịch này bao gồm

Axl-1613F12-MabZap gây ra độc tính gây độc tế bào có hiệu quả đối với các tế bào đích.

Ví dụ 2: Tạo ra kháng thể kháng ECD rhAxl.

Để tạo ra các kháng thể chuột đơn dòng (Mab) kháng miễn ngoại bào người (ECD) của thụ thể Axl, 5 con chuột BALB/c đã được gây miễn dịch 5 lần tiên dưới da với $15-20 \cdot 10^6$ tế bào CHO-Axl và hai lần với $20 \mu\text{g}$ rh ECD Axl. Việc gây miễn dịch lần thứ nhất được tiến hành với sự có mặt của Chất phụ gia Freund hoàn chỉnh (Sigma, St Louis, MD, USA). Chất phụ gia Freund không hoàn chỉnh (Sigma) được bổ sung cho các lần gây miễn dịch tiếp sau.

Ba ngày trước khi dung hợp, chuột đã được gây miễn dịch được tăng cường bằng cả $20 \cdot 10^6$ tế bào CHO-Axl lẫn $20 \mu\text{g}$ ECD rhAxl bằng IFA.

Để tạo ra các tế bào lai, tế bào lách và các tế bào lympho được chuẩn bị lần lượt bằng cách hút dịch lá lách và bằng cách thu lấy các u bạch huyết lân cận, thu hoạch được từ 1 trong số 5 con chuột đã được gây miễn dịch (được chọn sau khi chuẩn độ huyết thanh) và được dung hợp với SP2/0-Ag14 các tế bào u tủy (ATCC, Rockville, MD, USA). Quy trình dung hợp được mô tả trong ấn phẩm: Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975). Sau đó, các tế bào đã được dung hợp được chọn lọc HAT. Nói chung, để điều chế các kháng thể đơn dòng hoặc các đoạn chức năng của nó, nhất là có nguồn gốc từ chuột, có thể tham khảo kỹ thuật đã mô tả một cách cụ thể trong sách hướng dẫn: "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) hoặc đến kỹ thuật điều chế từ tế bào lai được mô tả bởi Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Khoảng 10 ngày sau khi dung hợp, các cụm tế bào lai được sàng lọc. Đối với việc sàng lọc sơ bộ, dịch nổi bề mặt của các tế bào lai được đánh giá khả năng tiết của Mab kháng protein ECD Axl bằng cách sử dụng ELISA. Đồng thời, phân tích FACS được tiến hành để chọn Mab cps khả năng gắn kết với tế bào Axl có mặt trên bề mặt tế bào bằng cách sử dụng cả wt CHO lẫn Axl biểu hiện các tế bào CHO (ATCC).

Ngay khi đó, các tế bào lai đã được chọn được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn và sau đó được sàng lọc về khả năng phản ứng của nó kháng protein ECD Axl. Sau đó, Mab được tách dòng được isotyp hóa bằng cách sử dụng kit isotyp hóa

(cat #5300.05, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Một dòng vô tính thu được từ mỗi tế bào lai được chọn và được nhân rộng.

Các thử nghiệm ELISA được tiến hành như được nêu dưới đây hoặc là bằng cách sử dụng dịch nổi bề mặt tế bào lai tinh khiết hoặc, khi hàm lượng IgG trong dịch nổi bề mặt được xác định, chuẩn độ được thực hiện bắt đầu ở 5 µg/ml. Sau đó, việc pha loãng theo dãy được tiến hành theo 11 hàng sau. Vắn tắt, đĩa ELISA 96 lỗ (Costar 3690, Corning, NY, USA) được phủ protein rh Axl-Fc (R and D Systems, cat N° 154-AL) với lượng 50 µl/lỗ hoặc ECD rhAxl với lượng 2 µg/ml trong PBS qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, đĩa này được phong bế bằng PBS chứa 0,5% gelatin (#22151, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Một khi chất đệm bão hòa được bỏ đi bằng cách búng đĩa, 50 µl dịch nổi bề mặt tế bào lai tinh khiết hoặc 50 µl dung dịch µg/ml được bổ sung vào đĩa ELISA và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau ba lần rửa, 50 µl IgG dê kháng chuột đa dòng được tiếp hợp peroxidaza cây cải ỏ ven biển (#115-035-164, Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) được bổ sung ở nồng độ pha loãng 1/5000 trong PBS chứa 0,1% gelatin và 0,05% Tween 20 (khối lượng:khối lượng) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, đĩa ELISA được rửa 3 lần và cơ chất TMB (#UP664782, Uptima, Interchim, France) được bổ sung vào. Sau 10 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, phản ứng được dừng lại bằng cách sử dụng axit sulfuric 1M và mật độ quang ở 450 nm được đo.

Đối với việc chọn lọc bằng cách đếm tế bào theo dòng, 10⁵ tế bào (CHO wt hoặc CHO-Axl) được cho vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ trong PBS chứa 1% BSA và 0,01% natri azit (chất đệm FACS) ở nhiệt độ 4°C. Sau 2 phút ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút, chất đệm được loại bỏ và dịch nổi bề mặt chứa tế bào lai hoặc Mab đã được tinh chế (1 µg/ml) cần được thử nghiệm được bổ sung vào. Sau 20 phút ủ ở nhiệt độ 4°C, các tế bào được rửa hai lần và kháng thể dê kháng chuột được tiếp hợp Alexa 488 được pha loãng 1/500^o trong chất đệm FACS (#A11017, Molecular Probes Inc., Eugene, USA) được bổ sung vào và được ủ trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa lần cuối bằng chất đệm FACS, các tế bào được phân tích bằng FACS (Facsclibur, Becton-Dickinson) sau khi bổ sung propiđi iodoxua vào mỗi ống với nồng độ cuối 40 µg/ml. Các lỗ chứa một mình các tế bào và chứa các tế bào được ủ với kháng thể được tiếp hợp Alexa 488 thứ cấp được bao gồm dưới dạng đối chứng âm. Các đối chứng isotyp được sử dụng trong mỗi thử nghiệm (Sigma, ref

M90351MG). Ít nhất 5000 tế bào được đánh giá để tính toán giá trị trung bình của cường độ phát huỳnh quang (MFI).

Một cách chính xác hơn, quá trình dung hợp được tiến hành với 300.10^6 tế bào lách thu hoạch được và 300.10^6 tế bào u tuỷ (tỷ lệ 1:1). Sau đó, 200 tế bào trong huyền phù tế bào thu được được dàn mỏng với mật độ 2.10^6 tế bào/ml trong 30 đĩa có 96 lỗ.

Việc sàng lọc đầu tiên (khoảng vào ngày 14 sau khi dung hợp) cả bằng ELISA trên protein ECD rhAxl lẫn bằng phân tích FACS bằng cách sử dụng cả các tế bào wt CHO lẫn CHO biểu hiện Axl đã cho phép chọn 10 tế bào lai có mật độ quang (OD) trên 1 trên lớp phủ rh AxlECD và MFI dưới 50 trên các tế bào wt CHO và trên 200 trên các tế bào CHO-Axl.

10 tế bào lai này được nhân rộng và được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn. Một đĩa có 96 lỗ được chuẩn bị cho mỗi mã. 9 ngày sau khi dàn mỏng, dịch nổi bề mặt từ các đĩa tách dòng đầu tiên được sàng lọc bằng ELISA để xác định tính đặc hiệu gắn kết của nó đối với miền ngoại bào của protein rh AxlECD. Ba dòng vô tính của mỗi mã được nhân rộng và được isotyp hóa. Khi được tạo ra, các kháng thể kháng Axl được nghiên cứu tiếp về khả năng của nó trong việc được nội hóa sau khi gắn kết Axl trên bề mặt tế bào.

Ví dụ 3: Tính đặc hiệu gắn kết Axl

Trong ví dụ này, sự gắn kết của 1613F12 đầu tiên được nghiên cứu trên protein rhAxl-Fc. Sau đó, sự gắn kết của nó trên hai thành viên khác thuộc họ TAM, rhDtk-Fc và rhMer-Fc, được nghiên cứu.

Vấn tắt, các protein Axl-Fc người tái tổ hợp (R and D Systems, cat N° 154AL/CF), rhDtk (R and D Systems, cat N° 859-DK) hoặc rhMer-Fc (R and D Systems, cat N° 891-MR) được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C trong đĩa 96 lỗ Immulon II và, sau 1 giờ phong bế bằng dung dịch 0,5% gelatin, kháng thể đã được tinh chế 1613F12 được bổ sung vào trong 1 giờ nữa ở nhiệt độ 37°C ở nồng độ ban đầu bằng 5 µg/ml ($3,33 \cdot 10^{-8}$ M). Sau đó, việc pha loãng theo dãy được tiến hành trên 12 cột. Các đĩa được rửa và IgG-HRP đặc hiệu dê kháng chuột (Jackson) được bổ sung trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Việc phát triển phản ứng được tiến hành bằng cách sử dụng dung dịch cơ chất TMB. Kháng thể đối chứng isotyp mIgG1 và kháng thể kháng Axl Mab 154 thương phẩm cũng được sử dụng đồng thời. Các đối chứng phủ

được tiến hành với sự có mặt của huyết thanh đa dòng dê kháng người IgG Fc được đánh dấu bằng HRP (Jackson, ref 109-035-098) và/hoặc với sự có mặt của kháng thể kháng Histidin được liên hợp HRP (R and D Systems, ref : MAB050H). Các kết quả lần lượt được thể hiện trên Fig.2A, Fig.2B và Fig.2C.

Ví dụ này cho thấy rằng kháng thể 1613F12 chỉ liên kết với protein rhAxl-Fc và không liên kết trên hai thành viên còn lại thuộc họ TAM, rhDtk hoặc rhMer. Không quan sát thấy tính đặc hiệu chéo gắn kết giữa kháng thể 1613F12 và các thành viên TAM. Không quan sát thấy sự gắn kết đặc hiệu khi không có mặt kháng thể sơ cấp (chất pha loãng). Không quan sát thấy sự gắn kết khi có mặt của kháng thể đối chứng isotyp.

Ví dụ 4: 1613F12 ghi nhận dạng tế bào Axl được biểu hiện trên các tế bào khối u

Mức độ biểu hiện Axl trên bề mặt tế bào trên các tế bào khối u người đầu tiên được thiết lập bằng cách sử dụng kháng thể Axl thương phẩm (R and D Systems, ref: MAB154) song song với các hạt hiệu chỉnh để cho phép định lượng mức độ biểu hiện Axl. Thứ hai là, việc gắn kết của Axl trên bề mặt tế bào được nghiên cứu bằng cách sử dụng 1613F12.

Đối với các nghiên cứu gắn kết bề mặt tế bào, việc pha loãng theo dãy gấp hai lần dung dịch kháng thể sơ cấp có nồng độ $10 \mu\text{g/ml}$ ($6,66 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) (1613F12, kháng thể MAB154 hoặc Mab đối chứng isotyp mIgG1 9G4) được điều chế và được đưa lên $2 \cdot 10^5$ tế bào trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C . Sau 3 lần rửa trong nước muối đệm phosphat (PBS) có bổ sung 1% BSA và 0,01% NaN_3 , các tế bào được ủ với kháng thể thứ cấp dê kháng chuột Alexa 488 (pha loãng $1/500^\circ$) trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C . Sau 3 lần rửa bổ sung trong PBS có bổ sung 1% BSA và 0,1% NaN_3 , các tế bào được phân tích bằng FACS (Facscalibur, Becton-Dickinson). Ít nhất 5000 tế bào được đánh giá để tính toán giá trị trung bình của cường độ phát huỳnh quang.

Để xác định định lượng ABC bằng cách sử dụng kháng thể MAB154, các hạt hiệu chỉnh QIFIKIT[®] được sử dụng. Sau đó, các tế bào được ủ, song song với các hạt QIFIKIT[®], với globulin miễn dịch/FITC Dê Kháng Chuột đa dòng, F(ab')_2 Dê, ở nồng độ bão hòa. Sau đó, số các vị trí kháng nguyên trên các tế bào mẫu được xác định bằng cách nội suy từ đường cong hiệu chỉnh (cường độ phát huỳnh quang của nhóm hạt riêng rẽ theo số phân tử Mab trên các hạt).

4.1. Định lượng mức độ biểu hiện Axl trên bề mặt tế bào

Mức độ biểu hiện Axl trên bề mặt của các tế bào khối u người được xác định bằng cách đếm tế bào theo dòng sử dụng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (phương pháp QIFIKIT[®] (Dako, Denmark), kit định lượng đếm tế bào theo dòng để đánh giá kháng nguyên bề mặt tế bào. So sánh cường độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) của các mức kháng nguyên đã biết trong các hạt qua đồ thị hiệu chỉnh cho phép xác định khả năng gắn kết kháng thể (ABC) của các dòng tế bào.

Bảng 6 thể hiện mức độ biểu hiện Axl được phát hiện trên bề mặt của các dòng tế bào khối u người khác nhau (SN12C, Calu-1, A172, A431, DU145, MDA-MB435S, MDA-MB231, PC3, NCI-H226, NCI-H125, MCF7, Panc1) (ATCC, NCI) như được xác định bằng cách sử dụng QIFIKIT[®] bằng cách sử dụng MAB154 kháng thể thương phẩm (R and D Systems). Các giá trị được cho dưới dạng phức hợp gắn kết kháng nguyên (ABC).

Bảng 6

	MCF7	NCI-H125	MDA-MB-435S	Panc1	MDA-MB-231	Calu-1	SN12C
Loại khối u/cơ quan	Ngực	NSCLC	Ngực	Tụy	Ngực	Phổi	Thận
ABC (Qifikit)	71	5 540	17 814	36 809	61 186	>100 000	> 100 000

	A172	A431	DU-145	PC3	NCI-H226
Loại khối u/cơ quan	u nguyên bào xốp	caxinom dạng biểu bì	Tuyến tiền liệt	tuyến tiền liệt	NSCLC
ABC (Qifikit)	52421	3953	55268	8421	32142

Các kết quả thu được với kháng thể Axl đơn dòng thương phẩm (MAB154) đã cho thấy thụ thể Axl được biểu hiện ở các mức khác nhau phụ thuộc vào tế bào khối u người xem xét.

4.2. Phát hiện Axl bằng 1613F12 trên các tế bào khối u người

Cụ thể hơn, sự gắn kết Axl được nghiên cứu bằng cách sử dụng 1613F12.

Đường cong đáp ứng nồng độ 1613F12 được dựng. MFI thu được bằng cách sử dụng các tế bào khối u người khác nhau sau đó được phân tích bằng phần mềm Prism. Dữ liệu được thể hiện trên Fig.3.

Dữ liệu đã cho thấy rằng 1613F12 gắn kết đặc hiệu với thụ thể Axl màng khi được xác nhận bằng đặc tính đường cong bão hoà. Tuy nhiên, các cường độ khác nhau của chất đánh dấu được quan sát, cho thấy các mức thay đổi của thụ thể Axl trên bề mặt tế bào của các tế bào khối u người. Không quan sát thấy sự gắn kết của thụ thể Axl bằng cách sử dụng MCF7 dòng tế bào khối u vú ở người.

Ví dụ 5: Tính đặc hiệu chéo của 1613F12 giữa các loài

Để đánh giá tính đặc hiệu chéo của 1613F12 giữa các loài, hai loài được xem xét: chuột và khỉ. Đầu tiên, sự gắn kết trên thụ thể Axl chuột tái tổ hợp (rm) được nghiên cứu bằng ELISA (Fig.4). Sau đó, thử nghiệm đếm tế bào theo dòng được tiến hành bằng cách sử dụng các tế bào COS7 khi các tế bào này biểu hiện thụ thể Axl trên bề mặt của nó (Fig.5). Dòng tế bào COS7 thu được bằng cách làm bất tử dòng tế bào CV-1 thu được từ các tế bào thận của khỉ xanh châu Phi với phiên bản bộ genSV40 có thể tạo ra kháng nguyên T lớn nhưng có khiếm khuyết về khả năng sao chép của bộ gen.

ELISA rmAxl-Fc

Vấn tắt, các protein Axl-Fc chuột tái tổ hợp (R and D Systems, cat N° 854-AX /CF) được phủ qua đêm lên đĩa có 96 lỗ Immulon II ở nhiệt độ 4°C và, sau 1 giờ phong bế bằng dung dịch gelatin 0,5%, kháng thể 1613F12 đã được tinh chế được bổ sung vào trong thời gian 1 giờ nữa ở nhiệt độ 37°C ở nồng độ ban đầu 5 µg/ml ($3,33 \cdot 10^{-8}$ M). Sau đó, việc pha loãng theo dãy được tiến hành trên 12 cột. Sau đó, các đĩa được rửa và IgG HRP đặc hiệu dê kháng chuột (Jackson) được bổ sung vào trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Việc phát triển phản ứng được tiến hành bằng cách sử dụng

dung dịch cơ chất TMB. Đối chứng isotyp mIgG1 và kháng thể thương phẩm Mab 154 cũng được sử dụng đồng thời. Các đối chứng phủ được tiến hành với sự có mặt của huyết thanh đa dòng IgG Fc dê kháng người được liên hợp với HRP (Jackson, ref 109-035-098) và/hoặc với sự có mặt của kháng thể kháng Histidin được liên hợp với HRP (R and D Systems, ref : MAB050H).

Các kết quả được thể hiện trên Fig.4. Fig. này cho thấy rằng 1613F12 không gắn kết với miền ECD Axl chuột. Không quan sát thấy sự gắn kết đặc hiệu khi không có kháng thể sơ cấp (chất pha loãng).

FACS COS7

Đối với các nghiên cứu gắn kết tế bào 1613F12 bằng cách sử dụng các tế bào COS7, 2.10^5 tế bào được ủ với kháng thể có khoảng nồng độ được điều chế bằng cách pha loãng theo dãy (12 điểm) dung dịch kháng thể $10 \mu\text{g/ml}$ ($6,66 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) chứa 1613F12 hoặc Mab đối chứng isotyp mIgG1 đối với 20 phút ở nhiệt độ 4°C . Sau 3 lần rửa trong dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS) có bổ sung 1% BSA và 0,01% NaN_3 , các tế bào được ủ với kháng thể thứ cấp dê kháng chuột Alexa 488 (pha loãng 1/500) trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C . Sau 3 lần rửa thêm trong PBS có bổ sung 1% BSA và 0,1% NaN_3 , các tế bào được phân tích bằng FACS (Facsclibur, Becton-Dickinson). Ít nhất 5000 tế bào được đánh giá để tính toán giá trị trung bình của cường độ phát huỳnh quang. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Prism.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 5. Đường cong chuẩn độ được thiết lập trên các tế bào COS7 bằng cách sử dụng 1613F12 khẳng định rằng 1613F12 có thể nhận biết dạng thụ thể Axl của tế bào khi được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào COS7. Đoạn bằng trên đường cong đạt được đối với các nồng độ 1613F12 trên $0,625 \mu\text{g/ml}$ ($4,2 \cdot 10^{-10} \text{ M}$). Không quan sát thấy sự gắn kết khi có mặt đối chứng isotyp mIgG1.

Ví dụ này minh họa thực tế là 1613F12 không phản ứng chéo với thụ thể Axl chuột. Trái lại, nó gắn kết mạnh với thụ thể Axl khi được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào COS7.

Ví dụ 6: Thử nghiệm cạnh tranh Gas6 được tiến hành với sự có mặt của 1613F12

Để xác định thêm đặc điểm của 1613F12, thử nghiệm cạnh tranh Gas6 được tiến hành. Trong thử nghiệm này, protein rhAxl-Fc tự do và 1613F12 được ủ để tạo ra phức hợp kháng nguyên-kháng thể và sau đó các phức hợp này được nạp lên bề mặt được phủ Gas6 trong đĩa thử nghiệm. Các phức hợp kháng thể-kháng nguyên không gắn kết được rửa trước khi bổ sung kháng thể thứ cấp liên kết enzym kháng phần Fc người của protein rhAxl-Fc. Sau đó, cơ chất này được bổ sung vào và nồng độ kháng nguyên có thể được xác định bằng cường độ tín hiệu được gây ra bởi phản ứng enzym-cơ chất.

Vấn tắt, hỗn hợp phản ứng bao gồm protein rhAxl-Fc với sự có mặt hoặc không có mặt của Mab kháng Axl cần được thử nghiệm, được điều chế trên đĩa bảo hoà riêng rẽ (0,5% gelatin trong PBS 1X). Việc pha loãng theo dãy 1:2 (bắt đầu từ 80 µg/ml trên 12 cột) của các kháng thể kháng Axl chuột được tiến hành. Sau đó, 5 µg/ml protein rhAxl-Fc được bổ sung (R and D Systems, ref. 154AL/CF), ngoại trừ dòng đối chứng âm chỉ chứa chất pha loãng ELISA (0,1% gelatin, 0,05% Tween 20 trong PBS 1X). Sau khi làm đồng nhất, các mẫu cạnh tranh được nạp lên đĩa được phủ Gas6 với dung dịch rhGas6 6 µg/ml trong PBS (R and D Systems cat N° 885-GS-CS/CF). Sau khi ủ và vài lần rửa, các protein rhAxl-Fc gắn kết bằng cách sử dụng IgG-HRP dê kháng người (Jackson, ref. 109-035-098). Khi gắn kết, cơ chất TMB được bổ sung vào đĩa. Phản ứng này được dừng lại bằng cách bổ sung dung dịch axit H₂SO₄ 1M và mật độ quang thu được được đọc ở 450nm bằng cách sử dụng dụng cụ đọc vi đĩa.

Thử nghiệm này (Fig.6) cho thấy rằng 1613F12 có thể cạnh tranh với rhAxl-Fc gắn kết trên phối tử cố định của nó. Việc gắn kết cạnh tranh với Gas6 xảy ra với sự có mặt của kháng thể 1613F12 với các nồng độ trên 2,5 µg/ml ($1,67 \cdot 10^{-8}$ M). Không quan sát thấy có sự gắn kết nào nữa của rhAxl-Fc trên Gas6 cố định khi có mặt 1613F12 với nồng độ trên 10 µg/ml ($6,67 \cdot 10^{-8}$ M). 1613F12 phong bế sự gắn kết Gas6 với rhAxl-Fc.

Ví dụ 7: Nhận biết epitop bằng phương pháp thẩm tách tây

Để xác định việc 1613F12 nhận biết epitop thẳng hoặc cấu hình, phân tích thẩm tách tây được tiến hành bằng cách sử dụng dịch tan tế bào SN12C. Các mẫu được xử lý khác nhau trong các điều kiện khử hoặc không khử. Nếu một dải được hiển thị với mẫu đã được khử, kháng thể được thử nghiệm hướng đích tới epitop

thăng của miền ECD; nếu không, nó gây ra tác dụng kháng epitop cấu hình của ECD Axl.

Các tế bào SN12C được cấy vào RPMI + 10 % FBS được làm bất hoạt bằng nhiệt + 2 mM L-glutamin ở mật độ 5.10^4 các tế bào/cm² trong bình cầu T162 cm² trong thời gian 72 giờ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường chứa 5% CO₂. Sau đó các tế bào này được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS) và được phân giải bằng 1,5 ml dung dịch đệm phân giải đã được làm lạnh bằng nước đá [50 mM Tris-HCl (pH7,5); 150 mM NaCl; 1% Nonidet P40; 0,5% deoxycholat; và 1 viên nén hỗn hợp chất ức chế proteaza hoàn chỉnh cộng với 1% antiprophosphatase]. Dịch tan tế bào được lách trong thời gian 90 phút ở nhiệt độ 4°C và được lọc trong ở tốc độ 15000 vòng/phút trong 10 phút. Nồng độ protein được định lượng bằng cách sử dụng BCA. Các mẫu khác nhau được nạp. Đầu tiên, 10 µg toàn bộ dịch tan tế bào (10 µg trong 20 µl) được điều chế trong các điều kiện khử (1x mẫu chất đệm (BIORAD) + 1x chất khử (BIORAD)) và được nạp lên SDS-PAGE sau khi ủ 2 phút ở nhiệt độ 96°C. Sau đó, hai mẫu khác, mỗi mẫu 10 µg toàn bộ dịch tan tế bào được điều chế trong các điều kiện không khử (trong 1x mẫu chất đệm (BIORAD) duy nhất). Trước khi được nạp lên gel SDS-PAGE, một trong số hai mẫu cuối này được ủ trong thời gian 2 phút ở nhiệt độ 96°C; mẫu còn lại được giữ trên nước đá. Sau quá trình di trú, protein được chuyển đến màng nitrocellulose. Màng được làm bão hòa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng TBS-tween 20 0,1% (TBST), 5% sữa không béo và được lai thử bằng 1613F12 với nồng độ 10 µg/ml qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Các kháng thể được pha loãng trong dung dịch nước muối được đệm Tris-0,1% tween 20 (thể tích/thể tích) (TBST) với 5% sữa bột không béo. Sau đó, các màng được rửa bằng TBST và được ủ với kháng thể thứ cấp được tiếp hợp peroxidaza (pha loãng 1/1000) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các protein phản ứng miễn dịch được hiển thị bằng ECL (Pierce #32209). Sau khi hiển thị Axl, các màng được rửa thêm một lần bằng TBST và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với kháng thể chuột kháng GAPDH (pha loãng 1/200 000). Sau đó, các màng được rửa trong TBST và được ủ với các kháng thể thứ cấp được tiếp hợp peroxidaza, trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các màng được rửa và GAPDH được phát hiện bằng cách sử dụng ECL.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 7.

1613F12 chủ yếu nhận biết epitop cấu hình dưới dạng dải cụ thể được quan sát chủ yếu trong các điều kiện không khử. Tuy nhiên tín hiệu mờ nhạt được phát hiện trong điều kiện di trú không biến tính của dịch tan tế bào SN12C cho biết rằng 1613F12 có thể gắn kết yếu với epitop thẳng.

Ví dụ 8: Đo quá trình điều hòa giảm Axl được gây ra bởi 1613F12 bằng phương pháp thẩm tách tây

Trong ví dụ sau, dòng tế bào caxinom tế bào thận người SN12C (ATCC) được chọn đối với hoạt tính của các kháng thể Axl theo mức độ biểu hiện của thụ thể Axl. Dòng tế bào SN12C biểu hiện quá mức thụ thể Axl. Quá trình điều hòa giảm Axl được nghiên cứu bằng phương pháp thẩm tách tây trên toàn bộ các phần chiết tế bào trên Fig. 8A-Fig.8B.

Các tế bào SN12C được cấy vào RPMI + 10 % FBS được làm bất hoạt bằng nhiệt + 2 mM L-glutamin ở mật độ 6.10^4 tế bào/cm² trong các đĩa có 6 lỗ trong thời gian 48 giờ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO₂. Sau hai lần rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS), các tế bào được bỏ đối trong huyết thanh trong môi trường chứa 800 ng/ml phối tử gas6 chuột tái tổ hợp (R and D Systems, ref: 986-GS/CF) hoặc 10 µg/ml kháng thể đối chứng isotyp mIgG1 (9G4) hoặc 10 µg/ml kháng thể Axl theo sáng chế và được ủ trong 4 giờ hoặc 24 giờ bổ sung. Sau đó, môi trường được loại bỏ nhẹ nhàng và các tế bào được rửa hai lần bằng PBS lạnh. Các tế bào được phân giải bằng 200µl dung dịch đệm phân giải đã được làm lạnh bằng nước đá [50 mM Tris-HCl (pH=7,5); 150 mM NaCl; 1% Nonidet P40; 0,5% deoxycholat; và 1 viên nén hỗn hợp chất ức chế proteaza hoàn chỉnh cộng với 1% antiprophosphatase]. Dịch tan tế bào được lắc trong thời gian 90 phút ở nhiệt độ 4°C và được lọc trong ở tốc độ 15000 vòng/phút trong 10 phút. Nồng độ protein được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp BCA. Toàn bộ dịch tan tế bào (10 µg trong 20 µl) được tách ra bằng SDS-PAGE và được chuyển đến màng nitrocellulose. Các màng được làm bão hòa trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng với TBS-Tween 20 0,1% (TBST), 5% không béo sữa và được lai thử bằng kháng thể Axl M02 thương phẩm với nồng độ 0,5 µg/ml (AbNova H00000558-M02) qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Các kháng thể này được pha loãng trong dung dịch nước muối được đệm Tris-0,1% tween 20 (thể tích/thể tích) (TBST) với 5% sữa bột không béo. Sau đó, các màng được rửa bằng TBST và được ủ với thể tiếp hợp peroxidaza kháng thể thứ cấp (pha

loãng 1/1000) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các protein phản ứng miễn dịch được hiển thị bằng ECL (Pierce #32209). Sau khi hiển thị Axl, các màng được rửa lại một lần bằng TBST và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với kháng thể chuột kháng GAPDH (pha loãng 1/200000). Sau đó, các màng được rửa trong TBST và được ủ với các kháng thể thứ cấp được tiếp hợp peroxydaza, trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các màng được rửa và GAPDH được phát hiện bằng cách sử dụng ECL. Cường độ dải được định lượng bằng mật độ kế.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.8A và Fig.8B đại diện cho 3 thử nghiệm độc lập và chứng tỏ rằng 1613F12 có khả năng điều hòa giảm Axl ở dòng tế bào khối u người biểu hiện quá mức Axl. Ở thời điểm 4 giờ, 1613F12 làm điều hòa giảm Axl 66 %, và tới 87 % sau khi ủ 24 giờ với 1613F12.

Ví dụ 9: Nghiên cứu đếm tế bào theo dòng đối với tác dụng của 1613F12 đến mức độ biểu hiện Axl trên bề mặt tế bào

Kỹ thuật đếm tế bào theo dòng cho phép đánh dấu thụ thể Axl trên bề mặt tế bào. Việc sử dụng kỹ thuật này có thể làm nổi bật được tác dụng của các kháng thể đến sự biểu hiện Axl trên màng. Các tế bào SN12C khối u thận người biểu hiện Axl với mức cao được sử dụng trong ví dụ này.

Dòng tế bào khối u SN12C được nuôi cấy trong RPMI1640 với 1% L-glutamin và 10% FCS trong thời gian 3 ngày trước khi thử nghiệm. Sau đó, các tế bào được tách ra bằng cách sử dụng trypsin và được dàn mỏng trong đĩa có 6 lỗ trong RPMI1640 với 1% L-glutamin và 5% FBS. Ngày hôm sau, các kháng thể quan tâm được bổ sung ở nồng độ 10 µg/ml. Các lỗ không được xử lý cũng được bao gồm. Các tế bào này được ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. 24 giờ sau, các tế bào được rửa bằng PBS, được tách ra và được ủ với các kháng thể quan tâm này trong chất đệm FACS (PBS, 1% BSA, 0,01% natri azit). Các lỗ không được xử lý cũng được nhuộm bằng kháng thể này để so sánh cường độ tín hiệu thu được với cùng một Mab ở các tế bào được xử lý và không được xử lý. Các tế bào được ủ trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C và được rửa ba lần bằng chất đệm FACS. Kháng thể IgG dê kháng chuột được đánh dấu Alexa 488 được ủ trong thời gian 20 phút và các tế bào được rửa ba lần trước khi phân tích FACS trên quần thể tế bào âm tính với propiđi iodua.

Hai thông số được xác định: (i) sự khác biệt về tín hiệu huỳnh quang được phát hiện trên bề mặt của các tế bào không được xử lý (no Ab) so với các tế bào được xử lý bằng Ab ở T24 giờ và (ii) giá trị phần trăm của Axl còn lại trên bề mặt tế bào. Giá trị phần trăm của Axl còn lại được tính toán như sau:

$$\% \text{ Axl còn lại} = (\text{MFI}_{\text{Ab 24 h}} / \text{MFI}_{\text{no Ab 24 h}}) \times 100$$

Dữ liệu từ một thử nghiệm đại diện được thể hiện trong bảng 7. Các kết quả này được lặp lại trong ba thử nghiệm độc lập.

Sự khác biệt MFI giữa việc nhuộm Mab trong các tế bào không được xử lý và điều kiện được xử lý với cùng một kháng thể phản ánh quá trình điều hòa giảm của protein Axl trên bề mặt của các tế bào do sự gắn kết của Mab được xem xét. Các trường hợp mà không có kháng thể cho các kết quả tương tự với các trường hợp có mặt của kháng thể đối chứng isotyp (m9G4).

Bảng 7

Đánh dấu	Xử lý	MFI ở T24 giờ	D (MFI _{No Ab 24 h} – MFI _{Ab 24 h})	% Axl còn lại
1613F12	No Ab	938	514	45,2
	1613F12	424		
9G4	No Ab	11	-2	117
	9G4	13		
MAB154	No Ab	950	ND	ND
	9G4	ND		

Các dữ liệu chứng tỏ rằng cường độ phát huỳnh quang trung bình được phát hiện trên bề mặt của các tế bào được xử lý bằng 1613F12 trong thời gian 24 giờ bị giảm (-514) so với MFI thu được với các tế bào không được xử lý được đánh dấu bằng 1613F12. Sau khi ủ trong thời gian 24 giờ với kháng thể 1613F12, 45,2% thụ thể Axl trên bề mặt tế bào vẫn ở trên bề mặt tế bào SN12C.

Ví dụ 10: Nghiên cứu nội hóa 1613F12 bằng cách đánh dấu hóa mô miễn dịch huỳnh quang

Các kết quả nội hóa bổ trợ thu được bằng kính hiển vi đồng tiêu sử dụng phương pháp đánh dấu huỳnh quang gián tiếp.

Vấn tắt, dòng tế bào khối u SN12C được nuôi cấy trong RPMI1640 với 1 % L-glutamin và 10 % of FCS trong thời gian 3 ngày trước khi thử nghiệm. Sau đó, các tế bào này được tách ra bằng cách sử dụng trypsin và được dàn mỏng trong tấm kính phủ có đĩa có 6 lỗ trong RPMI1640 với 1 % L-glutamin và 5 % FCS. Ngày hôm sau, 1613F12 được bổ sung vào ở nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$. Các tế bào được xử lý bằng kháng thể không thích hợp cũng được bao gồm. Sau đó, các tế bào này được ủ trong 1 giờ và 2 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Đối với T 0 giờ, các tế bào được ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C để xác định sự gắn kết của kháng thể trên bề mặt tế bào. Các tế bào được rửa bằng PBS và cố định bằng paraformaldehyt trong thời gian 15 phút. Các tế bào được rửa và được ủ với kháng thể IgG Alexa 488 để kháng chuột trong thời gian 60 phút ở nhiệt độ 4°C để xác định kháng thể còn lại trên bề mặt tế bào. Để cho phép kháng thể thẩm thấu vào các tế bào, các tế bào được cố định và được thấm saponin. IgG Alexa 488 để kháng chuột (Invitrogen) được sử dụng để nhuộm cả kháng thể màng lẫn kháng thể nội bào. Các hạt cơ quan nội bào sớm được xác định bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng của thỏ kháng EEA1 được biểu lộ với kháng thể IgG-Alexa 555 để kháng thỏ (Invitrogen). Các tế bào được rửa ba lần và nhân được nhuộm bằng cách sử dụng Draq5. Sau khi nhuộm, các tế bào được định vị trong môi trường định vị Prolong Gold (Invitrogen) và được phân tích bằng cách sử dụng kính hiển vi đồng tiêu Zeiss LSM 510.

Các ảnh chụp được thể hiện trên Fig.9A- Fig.9C.

Các hình ảnh thu được bằng kính hiển vi đồng tiêu. Với sự có mặt của đối chứng isotyp mIgG1 (9G4), không quan sát thấy sự nhuộm màng hay sự đánh dấu nội bào nào (Fig.9A). Sự mất dần của việc đánh dấu kháng Axl trên màng được quan sát ngay sau 1 giờ ủ các tế bào SN12C với 1613F12 (Fig.9B). Sự tích tụ nội bào của kháng thể 1613F12 được quan sát một cách rõ ràng ở thời điểm 1 giờ và 2 giờ (Fig.9C). Kháng thể nội bào cùng vị trí với EEA1, một chất đánh dấu endosom sớm. Các ảnh chụp này khẳng định sự nội hóa của 1613F12 trong các tế bào SN12C.

Ví dụ 11: Hoạt tính kháng khối u do kháng Axl gây ra *in vitro*

Thử nghiệm tăng sinh SN12C

Mười nghìn tế bào SN12C trong mỗi lỗ được cấy vào môi trường không chứa FCS trên các đĩa có 96 lỗ qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO₂. Ngày hôm sau, các tế bào được ủ sơ bộ với mỗi kháng thể với nồng độ 10 µg/ml trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào được xử lý bằng hoặc không được xử lý rmGas6 (R and D Systems, cat N°986-GS/CF), bằng cách bổ sung phối tử một cách trực tiếp vào lỗ, và sau đó để cho sinh trưởng trong thời gian 72 giờ. Mức độ tăng sinh được đo theo mức độ hợp nhất ³H thymidin.

Dữ liệu được thể hiện trên Fig.10. Không quan sát thấy tác dụng nào với 1613F12, nó không thể hiện tác dụng gì khi được bổ sung vào các tế bào SN12C.

Ví dụ 12: Hiệu lực độc tính gây độc tế bào của thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin ở các dòng tế bào khối u người khác nhau

Trong ví dụ này, hiệu lực độc tính gây độc tế bào của 1613F12 được liên hợp saporin được khảo chứng. Nhằm mục đích này, thử nghiệm độc tính gây độc tế bào *in vitro* trực tiếp bằng cách sử dụng rất nhiều dòng tế bào khối u người được tiến hành (Fig.11A- Fig.11K). Các dòng tế bào khối u này cho sự biểu hiện Ax1 trên bề mặt tế bào khác nhau.

Vấn tắt, 5000 tế bào được cấy trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ trong 100 µl môi trường nuôi cấy thích hợp chứa 5 % FBS (D0). Sau 24 giờ ủ trong môi trường 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C, khoảng nồng độ của thể tiếp hợp miễn dịch (1613F12-saporin hoặc 9G4-saporin hoặc chỉ 1613F12 hoặc 9G4) được áp dụng cho các tế bào này. Sau đó, các đĩa nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C thiết bị ủ chứa 5% CO₂ được làm ẩm trong thời gian 72 giờ.

Vào ngày thứ tư (D4), khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng bộ dụng cụ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability kit (Promega Corp., Madison, Wis.) cho phép xác định số tế bào có khả năng sống sót trong môi trường nuôi cấy dựa trên việc định lượng ATP có mặt, một chất chỉ báo các tế bào có hoạt động trao đổi chất. Sự phát quang được ghi lại bằng phát quang kế.

Từ sự phát quang, hiệu suất được tính toán bằng giá trị phần trăm của độc tính gây độc tế bào bằng cách sử dụng công thức sau:

$$\% \text{ độc tính gây độc tế bào} = 100 - [(RLU_{Ab-sap} \times 100) / RLU_{No Ab}]$$

Trên Fig.11A- Fig.11K được bố trí cùng các đồ thị thể hiện giá trị phần trăm độc tính gây độc tế bào theo nồng độ thể tiếp hợp miễn dịch thu được trong các thử nghiệm độc tính gây độc tế bào *in vitro* riêng biệt với các tế bào khối u (A) SN12C, (B) Calu-1, (C) A172, (D) A431, (E) DU145, (F) MDA-MB-435S, (G) MDA-MB-231, (H) PC3, (I) NCI-H226, (J) NCI-H125 hoặc (K) Panc1 được xử lý bằng thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin với một khoảng nồng độ.

Fig.11A- Fig.11K cho thấy rằng thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin đã gây ra độc tính gây độc tế bào trong các dòng tế bào khối u người khác nhau này. Hiệu lực của độc tính gây độc tế bào thu được tùy thuộc vào dòng tế bào khối u người.

Ví dụ 13: Làm miễn thay đổi của kháng thể 1613F12 giống như của người

Việc sử dụng các kháng thể chuột (Mab) để điều trị bệnh ở người nói chung có tác động bất lợi lớn, bệnh nhân xuất hiện đáp ứng kháng thể người kháng chuột (HAMA), nhờ đó làm giảm hiệu quả điều trị và phòng ngừa đang được tiếp tục thực hiện. Một cách để khắc phục được vấn đề này là làm cho Mab chuột giống như của người bằng cách thay các trình tự chuột bằng các trình tự người của nó nhưng không làm thay đổi hoạt tính gắn kết kháng nguyên. Điều này có thể đạt được bằng hai cách chính: (i) bằng cách xây dựng các kháng thể ghép chuột/người, trong đó vùng thay đổi ở chuột kết hợp vào vùng ổn định ở người (Boulianne *et al.*, 1984) và (ii) bằng cách ghép các vùng xác định tính hỗ trợ (CDR) từ vùng thay đổi ở chuột vào vùng thay đổi của người được chọn một cách cẩn thận và sau đó kết hợp các vùng thay đổi ở "người đã được tái định hình" này với vùng ổn định ở người (Riechmann *et al.*, 1988).

13.1. Thiết kế phiên bản kháng thể 1613F12 được làm giống như của người

13.1.1 Làm VL miễn thay đổi chuỗi nhẹ giống như của người

Như một bước sơ bộ, trình tự nucleotit của VL 1613F12 được so với phần trình tự gen dòng tế bào mầm ở chuột trong dữ liệu IMGT (<http://www.imgt.org>). Các gen dòng tế bào mầm IGKV16-104*01 và IGKJ5*01 chuột được xác định. Để xác định ứng viên ở người tốt nhất để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm ở người biểu hiện độ giống tối ưu với trình tự 1613F12 VL ở chuột được tra cứu. Với sự trợ giúp của các công cụ phân tích dữ liệu IMGT, các vùng V người tiếp nhận có thể đối với

CDR VL 1613F12 chuột được xác định: IGKV1-27*01 và IGKJ4*02. Để thực hiện việc làm miễn thay đổi chuỗi nhẹ giống như của người, mỗi gốc khác nhau giữa các trình tự người và chuột được cho dưới dạng một thứ tự xếp hạng ưu tiên. Các thứ tự ưu tiên này (1-4) được sử dụng để tạo ra 11 biến thể được làm giống như của người khác nhau của vùng thay đổi chuỗi nhẹ có tới 14 đột biến nghịch.

	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CD
1613F12VL	DVQITQSPSYLATSPGETITINCRAS	KSI.....SKY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SG
Homsap IGKV1-27*01	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS	QGI.....SNY	LAWYQKPGKVPKLLIY	AA
Ưu tiên	V I Y A T P E T I N 1 1 3 34 4 433 2		E T N 3 33	
h21613F12 (VL1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
h21613F12 (VL1I2V)	DVQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
h21613F12 (VL1M4I)	DIQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
h21613F12 (VL2.1)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
h21613F12 (VL2.1V49T)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKTPKLLIY	SG
h21613F12 (VL2.1P50N)	DVQITQSPSSLSASVGDRTITCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVNKLLIY	SG
h21613F12 (VL2.2)	DVQITQSPSSLSASVGDRTINCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
h21613F12 (VL2.2V49T)	DVQITQSPSSLSASVGDRTINCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKTPKLLIY	SG
h21613F12 (VL2.2P50N)	DVQITQSPSSLSASVGDRTINCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVNKLLIY	SG
h21613F12 (VL2.3)	DVQITQSPSSLSASVGDRTINCRAS	KSI.....SKY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SG
h21613F12 (VL3)	DVQITQSPSYLAASVGDITITINCRAS	KSI.....SKY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SG
	R2-IMGT	FR3-IMGT		
1613F12VL	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYYC			
Homsap IGKV1-27*01	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYYC		E F M F 4 4 4 2	
Ưu tiên				
h21613F12 (VL1)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYYC			
h21613F12 (VL1I2V)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYYC			
h21613F12 (VL1M4I)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYYC			
h21613F12 (VL2.1)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYYC			
h21613F12 (VL2.1V49T)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYYC			
h21613F12 (VL2.1P50N)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYYC			
h21613F12 (VL2.2)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYFC			
h21613F12 (VL2.2V49T)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYFC			
h21613F12 (VL2.2P50N)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYFC			
h21613F12 (VL2.3)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYFC			
h21613F12 (VL3)	S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISLQPEDVATYFC			
	CDR3-IMGT	FR4-IMGT		
1613F12VL	QQHHEYPLT	FGAGTELELK		
Homsap IGKJ4*02	LT FGGGTKVEIK			
Ưu tiên	A EL L 3 33 4			
h21613F12 (VL1)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL1I2V)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL1M4I)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL2.1)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL2.1V49T)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL2.1P50N)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL2.2)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL2.2V49T)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL2.2P50N)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL2.3)	QQHHEYPLT	FGGGTKVEIK		
h21613F12 (VL3)	QQHHEYPLT	FGAGTELEIK		

13.1.2 Làm VH miễn thay đổi chuỗi nặng giống như của người

Để xác định ứng viên ở người tốt nhất để ghép CDR, các gen dòng tế bào mầm ở chuột và người biểu hiện tương đồng tối ưu với 1613F12 VH được tra cứu. Trình tự nucleotit của 1613F12 VH được xếp thẳng hàng với cả các trình tự gen dòng tế bào mầm ở chuột và người bằng cách sử dụng phần mềm xếp thẳng hàng trình tự “IMGT/V-QUEST” là một phần trong dữ liệu IMGT. Việc xếp thẳng hàng các trình tự axit amin cũng được tiến hành để xác minh các kết quả xếp thẳng hàng trình tự nucleotit bằng cách sử dụng phần mềm “Align X” trong gói VectorNTI. Việc xếp thẳng hàng với chuột các gen dòng tế bào mầm đã cho thấy rằng gen V IGHV14-3*02 và gen J IGHJ2*01 dòng tế bào mầm của chuột là các gen dòng tế bào mầm chuột tương đồng nhất. Bằng cách sử dụng dữ liệu IMGT, chuột D-gen dòng tế bào mầm IGHD1-1*01 được xác định là trình tự tương đồng. Để chọn dòng tế bào mầm ở người thích hợp để ghép CDR, gen dòng tế bào mầm ở người có mức độ giống cao nhất với trình tự chuột VH 1613F12 được xác định. Với sự trợ giúp của dữ liệu IMGT và các công cụ, gen dòng tế bào mầm IGHV1-2*02 ở người và gen dòng tế bào mầm IGHJ5*01 J ở người được chọn làm các trình tự nhận ở người đối với CDR VH 1613F12 chuột. Để thực hiện việc làm miễn thay đổi chuỗi nặng giống như của người, mỗi gốc khác nhau giữa các trình tự người và chuột được cho trong một khoảng ưu tiên (1-4). Các giá trị ưu tiên này được sử dụng để tạo ra 20 biến thể được làm giống như của người khác nhau có vùng thay đổi chuỗi nặng có đến 18 đột biến nghịch.

FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CD (1-26)	(27-38)	(39-55)	(
1613F12			EVHLQQSGA.ELVKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDTY	IHWVKQRPQGLEWIGR	LD
Homsap IGHV1-2*02			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GYTF....TGYY	MHWVRQAPQGLEWMGW	IN
Priority			E H Q LV L T I K R E I R			
			3 2 3 33 3 3 1 3 4 4 3 2			
h21613F12 (VH1)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	MHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH1M39I)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH1W55RN66K)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	MHWVRQAPQGLEWMGR	LD
h21613F12 (VH1I84S)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	MHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH1S85N)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	MHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH1I84NS85N)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	MHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH2.1)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH2.1Q3H)			QVHLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH2.1W55R)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGR	LD
h21613F12 (VH2.1N66K)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH2.1W55RN66K)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGR	LD
h21613F12 (VH2.1R80S)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH2.1N66KR80S)			QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH2.2)			QVHLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGR	LD
h21613F12 (VH2.2M89L)			QVHLVQSGA.EVKKPGASVKVSCCKAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH2.3)			QVQLQSGA.EVKKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGW	LD
h21613F12 (VH2.3W55R)			QVQLQSGA.EVKKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGR	LD
h21613F12 (VH2.3Q3HW55R)			QVHLQSGA.EVKKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWMGR	LD
h21613F12 (VH2.4)			QVQLQSGA.EVKKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDTY	IHWVRQAPQGLEWIGR	LD
h21613F12 (VH3)			EVHLQSGA.ELVKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDTY	IHWVKQAPQGLEWIGR	LD
R2-IMGT		FR3-IMGT				
56-65)		(66-104)				
1613F12			PA..NGHT KYGPNFQ.GRATMTSDTSSNTAYLQLSSLTSEDNAVYYC			
Homsap IGHV1-2*02			PN..SGGT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
Prority			K GPN A S SN LQ S T E			
			2 344 4 2 11 33 4 4 4			
h21613F12 (VH1)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH1M39I)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH1W55RN66K)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTDRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH1I84S)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSSTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH1S85N)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSINTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH1I84NS85N)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.1)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.1Q3H)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.1W55R)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTDRDTSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.1N66K)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTDRDTSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.1W55RN66K)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTDRDTSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.1R80S)			PA..NGHT NYAQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.1N66KR80S)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.2)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.2M89L)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYLELSRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.3)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.3W55R)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.3Q3HW55R)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYMELSRRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH2.4)			PA..NGHT KYAQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYLELSRLSDDTAVYYC			
h21613F12 (VH3)			PA..NGHT KYGQKFQ.GRVTMTSDTSSNTAYLQLSRLSDDTAVYYC			
CDR3-IMGT		FR4-IMGT				
1613F12VH			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
Homsap IGHJ5*01				WGQGTTLTVSS		
Prority			TLS			
			444			
h21613F12 (VH1)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH1M39I)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH1W55RN66K)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH1I84S)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH1S85N)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH1I84NS85N)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.1)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.1Q3H)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.1W55R)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.1N66K)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.1W55RN66K)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.1R80S)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.1N66KR80S)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.2)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.2 M89L)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.3)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.3W55R)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.3Q3HW55R)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH2.4)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		
h21613F12 (VH3)			ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLTVSS		

13.2. Đánh giá hz1613F12 kháng m1613F12

Để xem liệu 1613F12 được làm giống như của người tương đương với dạng 1613F12 chuột của nó, các thử nghiệm gắn kết được tiến hành cả bằng ELISA bằng cách sử dụng các thử nghiệm protein rhAxl-Fc và bằng FACS bằng cách sử dụng các tế bào SN12C. Để bổ trợ, thử nghiệm độc tính gây độc tế bào *in vitro* trực tiếp được tiến hành bằng cách sử dụng các tế bào khối u thận người SN12C và dòng tế bào caxinom phổi người Calu-1.

Trước tiên, các thử nghiệm được thực hiện. Trong thử nghiệm này, đĩa có 96 lỗ (Immulon II, Thermo Fisher) được phủ bằng 5 µg/ml dung dịch 1613F12 trong 1x PBS, qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau bước làm bão hòa, khoảng nồng độ của protein rhAxl-Fc (R and D Systems, ref: 154-AL) (từ 5 µg/ml đến 0,02 µg/ml) được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trên các đĩa đã được phủ. Đối với bước hiển thị, kháng thể Axl đã được biotinyl hóa (trong sản phẩm hộp) được bổ sung với lượng 0,85 µg/ml trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Kháng thể Axl này thuộc nhóm epitop riêng biệt. Sau đó, dung dịch avidin-peroxidaza cây cải ốc ven biển ở nồng độ 1/2000° trong dung dịch đệm pha loãng được bổ sung vào các lỗ. Sau đó, dung dịch cơ chất TMB được bổ sung vào trong thời gian 5 phút. Sau khi bổ sung, dung dịch làm ngừng peroxydaza, độ hấp phụ ở 405 nm được đo bằng bộ đọc vi đĩa.

Fig.12 cho thấy rằng cả các kháng thể 1613F12 chuột lẫn được làm giống như của người đều gắn kết tương tự với protein rhAxl-Fc.

Đối với phân tích FACS, các tế bào SN12C được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 + 2 mM L-glutamin + 10% huyết thanh. Các tế bào được tách ra bằng cách sử dụng trypsin và nồng độ tế bào được điều chỉnh ở mức 1×10^6 tế bào / ml trong dung dịch đệm FACS. Thể tích 100µL hỗn dịch tế bào được ủ với các đối chứng isotyp hoặc các kháng thể kháng Axl với các nồng độ tăng dần trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các tế bào này được rửa ba lần bằng chất đệm FACS và được ủ trong thời gian 20 phút nữa bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp IgG Alexa488 kháng chuột hoặc kháng thể thứ cấp IgG Alexa488 kháng người ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối. Các tế bào này được rửa ba lần bằng dung dịch đệm FACS và được tái tạo huyền phù bằng 100µl dung dịch đệm FACS trước khi bổ sung propiđi iodua.

Các tế bào này được ủ với đối chứng isotyp hoặc các kháng thể kháng Axl với nồng độ tăng dần. m1613F12 tương ứng với 1613F12 chuột, c1613F12, tương ứng

với 1613F12 thể ghép và hz1613F12 tương ứng với kháng thể được làm giống như của người. EC_{50} được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism.

Như được minh họa trên Fig. 13, dạng được làm giống như của người của 1613F12 gắn kết các tế bào SN12C có EC_{50} tương đương với 1613F12 ở dạng thể ghép và ở dạng ở chuột. Các kết quả này đã chỉ ra rằng hz1613F12 đã nhận biết kháng nguyên Axl với các đặc tính gắn kết tương tự với 1613F12 chuột.

Các cách thức tiến hành thử nghiệm độc tính gây độc tế bào *in vitro* trực tiếp đã được mô tả trước đó trong Ví dụ 12. Trong ví dụ này, 4 thể tiếp hợp miễn dịch saporin được điều chế: m9G4-saporin, ch9G4-saporin, 1613F12-saporin và hz1613F12-saporin và được thử nghiệm trong hai kiểu tế bào (các tế bào khối u thận SN12C người và các tế bào caxinom phổi Calu-1 người).

Fig.14 cho thấy rằng cả hai đối chứng isotyp m9G4-saporin và ch9G4-saporin đều âm, và kháng thể Axl 1613F12-saporin được làm giống như của người gây ra các tác dụng gây độc tế bào tương tự trên các tế bào SN12C như thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin chuột.

Fig.15 cho thấy rằng thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin được làm giống như của người gây ra tác dụng gây độc tế bào tương tự đến các tế bào Calu-1 như thể tiếp hợp miễn dịch 1613F12-saporin ở chuột. Trái lại, cả hai đối chứng isotyp m9G4-saporin lẫn ch9G4-saporin đều cho thấy hoạt tính yếu (độc tính gây độc tế bào tối đa $\sim 10\%$) đối với các nồng độ kháng thể trên 10^{-9} M.

Ví dụ 14: Động học gắn kết của 1613F12 với ECD Axl người

Việc đo ái lực của 1613F12 sau đó được xác định bằng cách sử dụng Biacore. Biacore X được sử dụng để đo động học gắn kết của 1613F12 trên ECD Axl người.

Dụng cụ này dựa trên cơ sở hiện tượng quang học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được sử dụng bằng hệ Biacore cho phép phát hiện và đo sự tương tác protein-protein trong thời gian thực, mà không sử dụng các nhãn đánh dấu.

Vấn tất, các thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 làm bộ cảm biến sinh học. IgG thử được cố định trên các tế bào dòng chảy 1 và 2 (FC1 và FC2) của chip cảm biến CM5 ở mức 9300-10000 đơn vị đáp ứng (RU) bằng cách sử dụng hóa học liên hợp amin để hấp thụ các kháng thể.

Việc gắn kết được đánh giá bằng cách sử dụng nhiều chu trình. Mỗi chu trình đo được tiến hành bằng cách sử dụng tốc độ dòng bằng $30\mu\text{l/phút}$ trong chất đệm

HBS-EP. Sau đó, kháng thể Axl để thử nghiệm được hấp thụ trên chip này trong thời gian 1 phút chỉ trên FC2 để đạt giá trị hấp thụ trung bình bằng 311,8 RU (SD=5,1 RU) đối với 1613F12. Chất phân tích (kháng nguyên ECD Axl) được phun bắt đầu ở 200 nM và sử dụng việc pha loãng theo dãy hai lần để đo sơ bộ các giá trị k_a và k_d trong thời gian thực.

Khi kết thúc mỗi chu trình, các bề mặt được tái sinh bằng cách phun dung dịch glyxin hydroclorua 10mM có độ pH=1,5 để loại bỏ các phức hợp kháng thể-kháng nguyên cũng như kháng thể hấp thụ. Tín hiệu được cân nhắc tương ứng với sự chênh lệch về các tín hiệu được quan sát giữa FC1 và FC2 (FC2-FC1). Tỷ lệ kết hợp (k_a) và tỷ lệ phân ly (k_d) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir 1-1. Hằng số phân ly cân bằng (KD) được xác định là tỷ lệ k_a/k_d . Các giá trị thử nghiệm được phân tích bằng phần mềm Biaevaluation phiên bản 3,0. Phân tích χ^2 sẽ được tiến hành để đánh giá độ chính xác của dữ liệu.

Dữ liệu được tóm tắt trong bảng dưới đây 8.

Bảng 8

Kháng thể	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	χ^2
1613F12	$1,06 \cdot 10^5$	$2,42 \cdot 10^{-4}$	$2,29 \cdot 10^{-9}$	0,71 (0,6%)

Để tạo ra miền ngoại bào người (ECD) của Axl, ADN bổ trợ người mã hoá thụ thể AXL tan ở người đầu tiên được tách dòng thành vector biểu hiện pCEP4 bằng PCR. Sau đó, sản phẩm đã được tinh chế được phân giải bằng các enzym giới hạn HindIII và BamHI và được buộc vào vector biểu hiện pCEP4 mà đã được cắt trước bằng các enzym này. Cuối cùng, plasmit tái tổ hợp xác định được pCEP[AXL]His₆ còn được xác nhận bằng các lập trình tự ADN.

Sau đó, các tế bào HEK293E thích ứng hỗn dịch được nuôi cấy trong môi trường Ex-cell 293 (SAFC Biosciences) với 4 mM glutamin. Tất cả các lần chuyển nhiễm đều được tiến hành bằng cách sử dụng polyetylenimin mạch thẳng dài 25 kDa (PEI). Các tế bào đã được chuyển nhiễm được duy trì ở 37°C trong máy lắc ủ nhiệt với 5% CO₂ và lắc ở tốc độ 120 vòng/phút trong thời gian 6 ngày. Các tế bào được thu gom bằng cách ly tâm, và dịch nổi bề mặt chứa protein được đánh dấu His tái tổ hợp được xử lý để tinh chế trên cột Ni-NTA agarosa.

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Các thông tin liên quan tới (các) chủng vi sinh hoặc các vật liệu sinh học khác đã nộp lưu (Điều Rule 13bis PCT) Chuẩn bị bằng cách sử dụng	
0-1-1		Nộp trực tuyến PCT Phiên bản 3.5.000.231 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	Đơn Quốc tế No.	PCT/EP2012/071833
0-3	Ký hiệu lưu trữ hồ sơ của Đại diện hoặc Người nộp đơn	361629D30354

1	Các thông tin đưa ra ở dưới liên quan	
1-1	tới (các) chủng vi sinh hoặc vật liệu	
1-2	sinh học khác được trích dẫn trong phần mô tả ở: trang dòng	20;21;70 18-19;2,8-9,12-13;26-27,30-31
1-3	Thông tin nộp lưu	
1-3-1	Tên viện lưu ký	CNCM Collection Rationale de cultures de micro-organismes
1-3-2	Địa chỉ	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux,
1-3-3	Ngày nộp lưu	75724 Paris Cedex 15, France 28 tháng 7 năm 2011 (28.07.2011)
1-3-4	Số nộp lưu	CNCM 1-4505
1-5	Các quốc gia được chỉ định đối với các thông tin được đưa ra	Tất cả các thông tin

CHỈ DÙNG CHO CƠ QUAN NHẬN ĐƠN

0-4	Tờ khai này được nộp cùng với đơn quốc tế: (có hoặc không)	Có
0-4-1	Cán bộ nhận đơn	Mailliard, Nathalie

CHỈ DÙNG CHO VĂN PHÒNG QUỐC TẾ BUREAU

0-5	Tờ khai này được tiếp nhận bởi văn phòng Quốc tế ngày	
0-5-1	Cán bộ nhận đơn	

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó protein gắn kết kháng nguyên hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này: i) gắn kết đặc hiệu với protein Axl ở người và ii) được nội hóa sau khi gắn kết với protein Axl ở người nêu trên, và trong đó protein gắn kết kháng nguyên này là kháng thể, kháng thể này bao gồm ba vùng xác định tính bổ trợ (CDR) chuỗi nhẹ CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 bao gồm lần lượt các trình tự SEQ ID NO. 1, 2, và 3; và ba vùng xác định tính bổ trợ (CDR) chuỗi nặng CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 bao gồm lần lượt các trình tự SEQ ID NO. 4, 5, và 6.

2. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này gây ra việc làm giảm cường độ phát huỳnh quang trung bình (MFI - Mean Fluorescence Intensity) đo được bằng kỹ thuật phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS - Florescence-activated cell sorting) ít nhất là 200.

3. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên này là kháng thể đơn dòng.

4. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm:
 - i) miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống với trình tự SEQ ID NO.7 ít nhất là 80%,
 - ii) miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 36 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống với trình tự SEQ ID NO. 36 ít nhất là 80%; và
 - iii) miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 37 đến 47 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống với các trình tự SEQ ID NO. 37 đến 47 ít nhất là 80%.

5. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này chứa miền thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm:

i) miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống với SEQ ID NO.8 ít nhất là 80%;

ii) miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 48 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống với SEQ ID NO. 48 ít nhất là 80%; và

iii) miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 49 đến 68 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống với các trình tự SEQ ID NO. 49 đến 68 ít nhất là 80%.

6. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

i) miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 7, 36 hoặc 37 đến 47 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống với các trình tự SEQ ID NO.7, 36 hoặc 37 đến 47 ít nhất là 80%; và

ii) miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO. 8, 48 hoặc 49 đến 68 hoặc trình tự bất kỳ có độ giống với các trình tự SEQ ID NO.8, 48 hoặc 49 đến 68 ít nhất là 80%.

7. Protein gắn kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên này bao gồm kháng thể đơn dòng 1613F12 được sản xuất bởi tế bào lai I-4505 được lưu giữ tại Trung tâm sưu tập giống nuôi cấy vi sinh vật quốc gia (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - CNCM), Viện Pasteur, Pháp, vào ngày 28 tháng bảy năm 2011, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

8. Tế bào lai I-4505 ở chuột được lưu giữ tại CNCM, Viện Pasteur, Pháp, vào ngày 28 tháng bảy năm 2011.

9. Thể tiếp hợp miễn dịch, bao gồm protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1 được tiếp hợp với tác nhân gây độc tế bào.

10. Dược phẩm, chứa thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 9 và ít nhất một tá dược và/hoặc chất dẫn thuốc được dụng.
11. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó protein Axl ở người theo điểm 1 có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO. 29 hoặc 30, hoặc trình tự biến thể tự nhiên của nó.
12. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong miền ngoại bào protein Axl ở người có trình tự SEQ ID NO. 31 hoặc 32 hoặc trình tự biến thể tự nhiên của nó.
13. Protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO. 47 và miền thay đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO 68.
14. Thể tiếp hợp miễn dịch, bao gồm protein gắn kết kháng nguyên, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 13 được tiếp hợp với tác nhân gây độc tế bào.
15. Dược phẩm, chứa thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 14 và ít nhất một tá dược và/hoặc chất dẫn thuốc được dụng.

Thử nghiệm độc tính gây độc tế bào SN12C của 1613F12

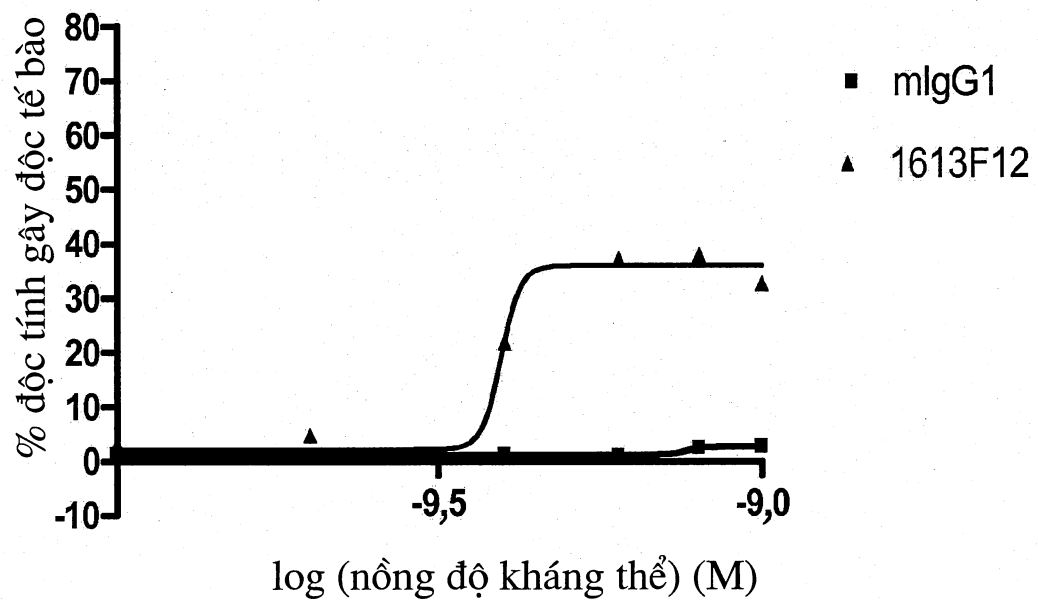


FIG. 1

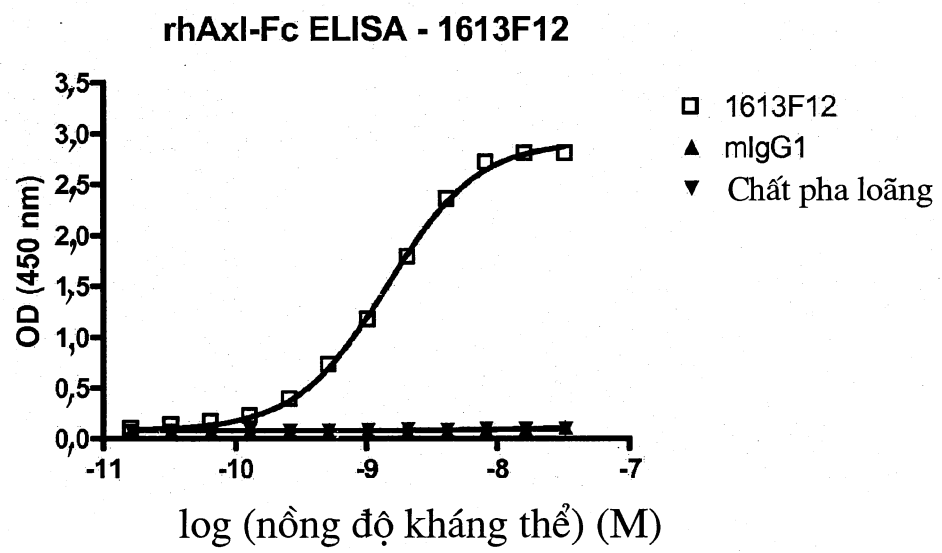


FIG. 2A

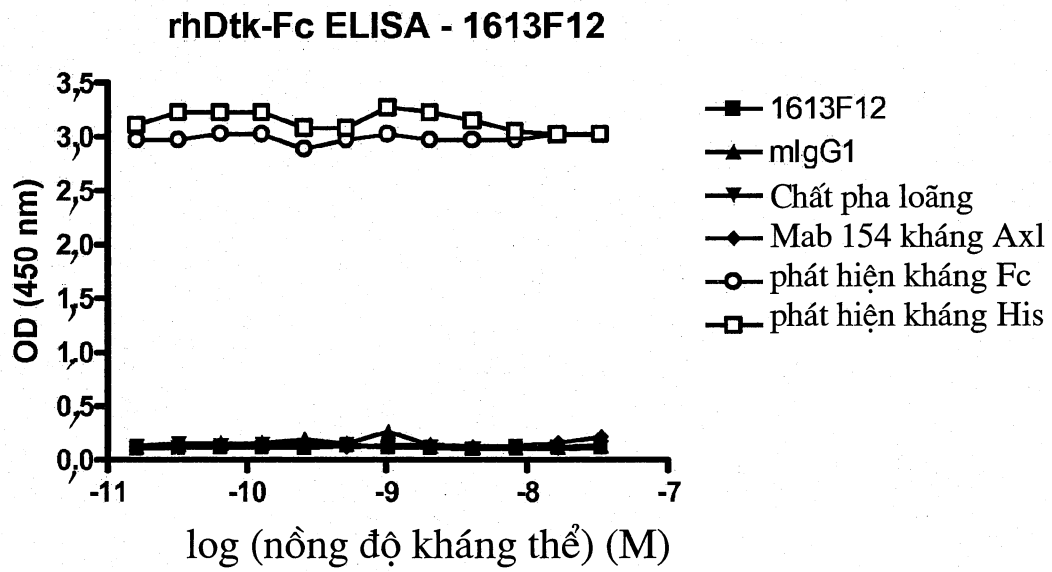


FIG. 2B

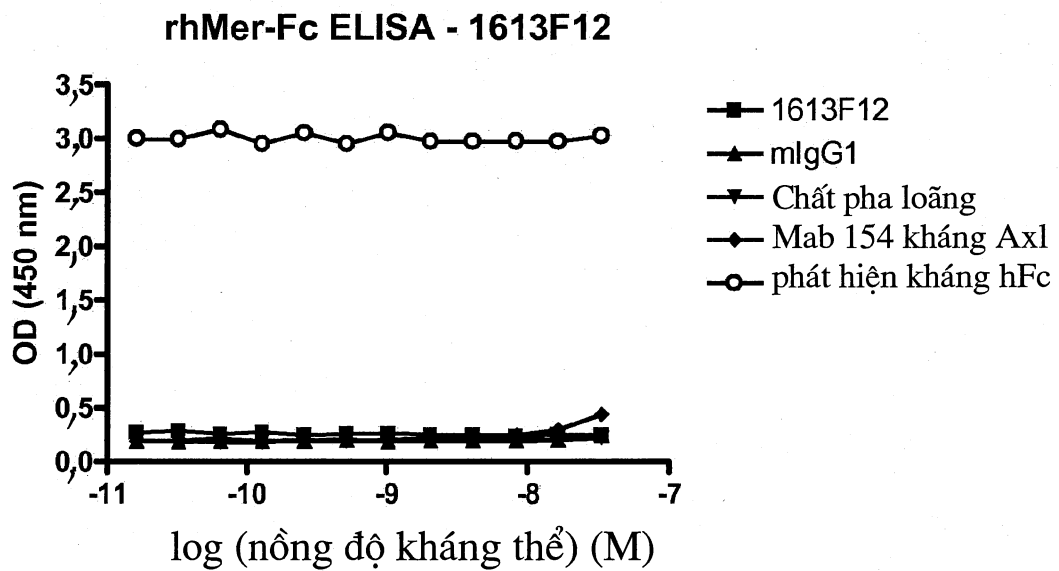


FIG. 2C

FACS dòng tế bào khối u người - 1613F12

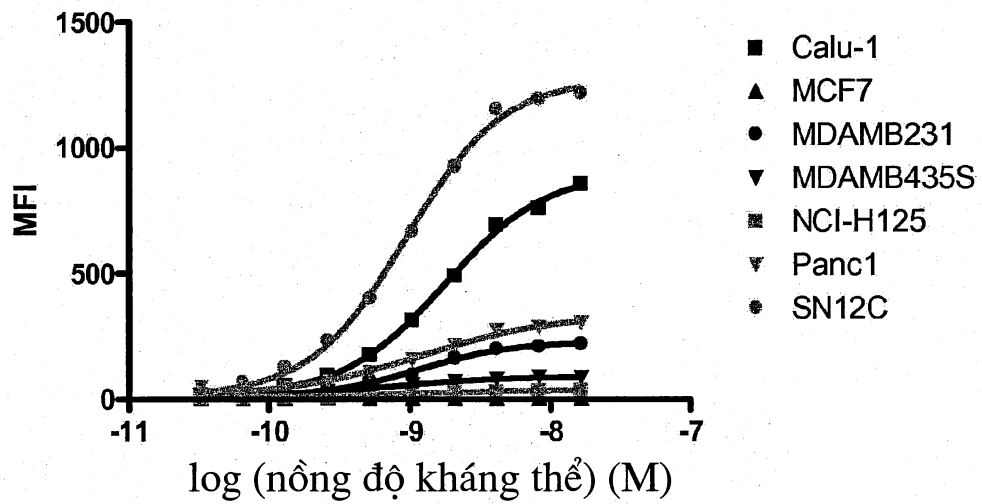


FIG. 3

rmAxl-Fc ELISA - 1613F12

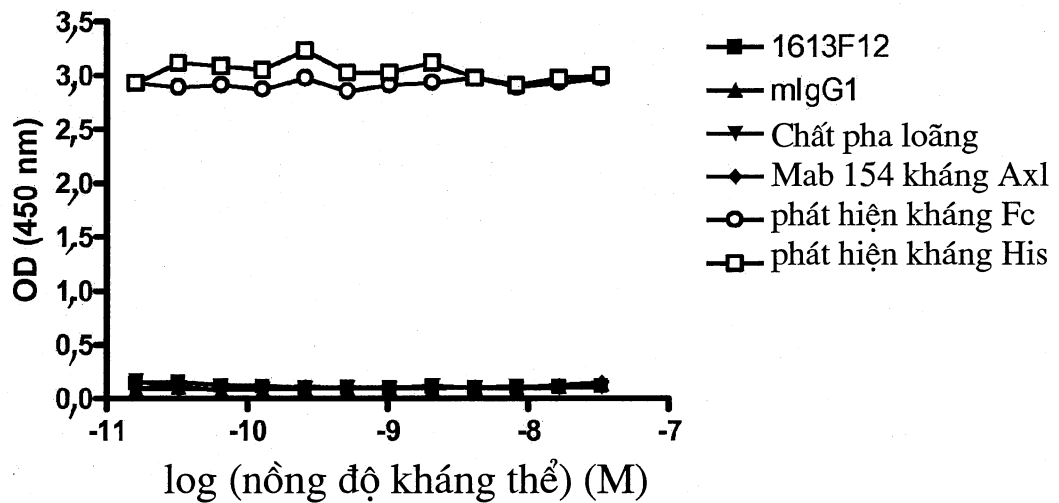


FIG. 4

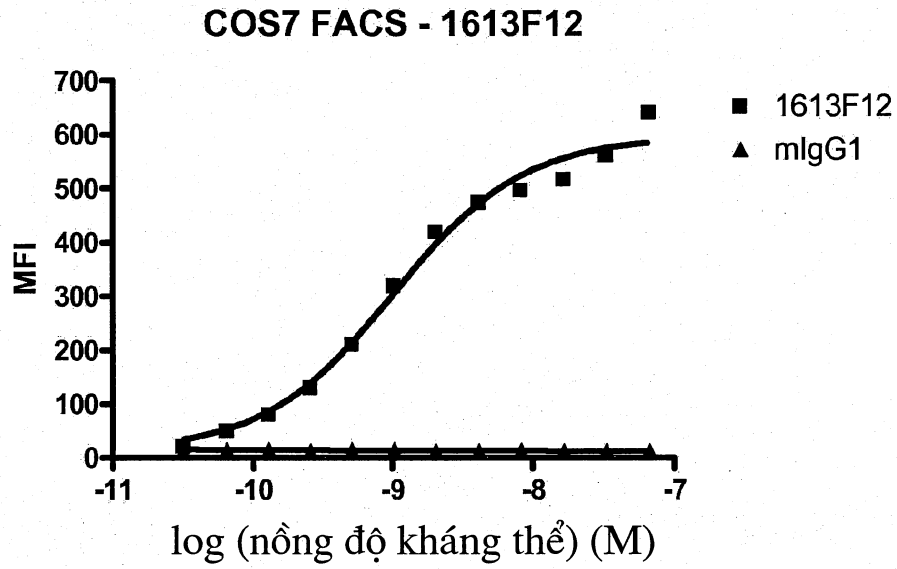


FIG. 5

Cạnh tranh gắn kết Gas6 của 1613F12 được xác định bằng ELISA

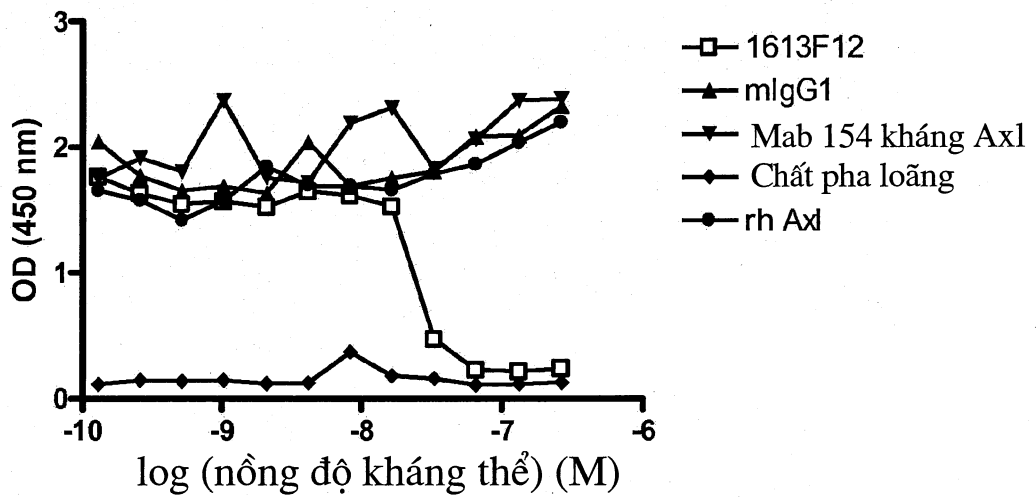


FIG. 6

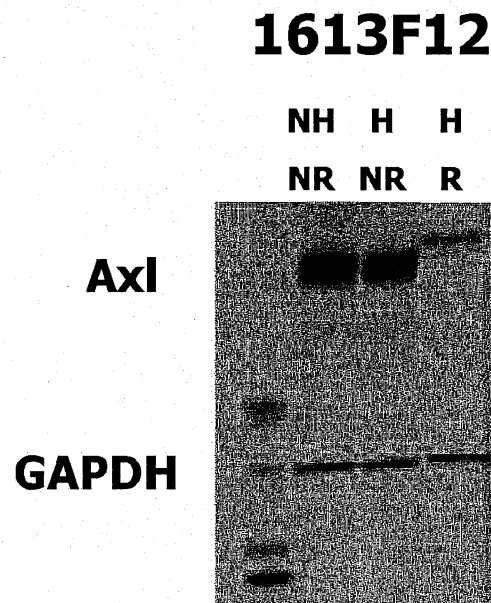


FIG. 7

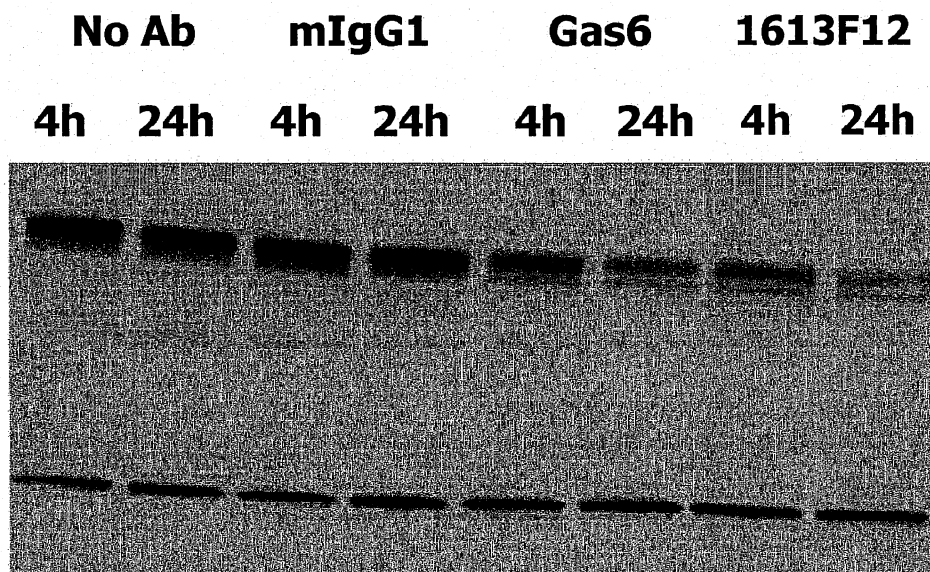


FIG. 8A

Quá trình điều hòa giảm của thụ thể Axl sau khi ủ với
1613F12 trên các tế bào SN12C

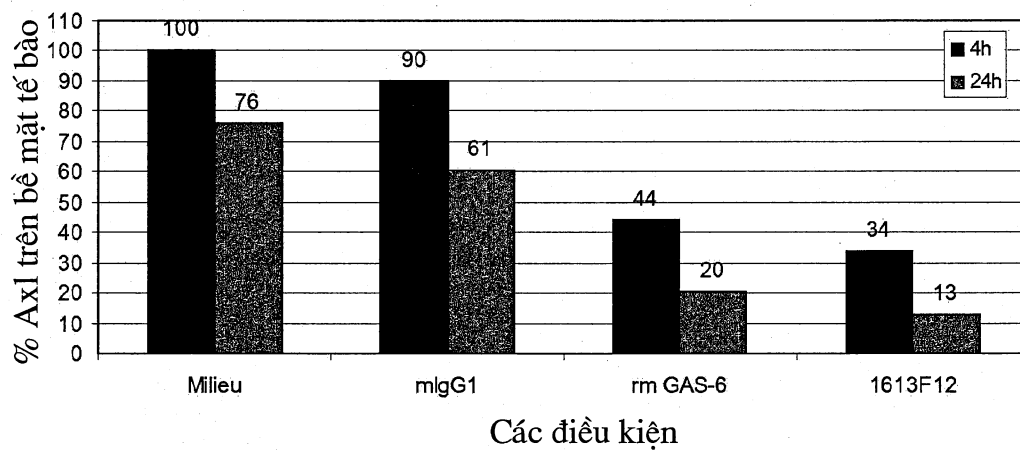


FIG. 8B

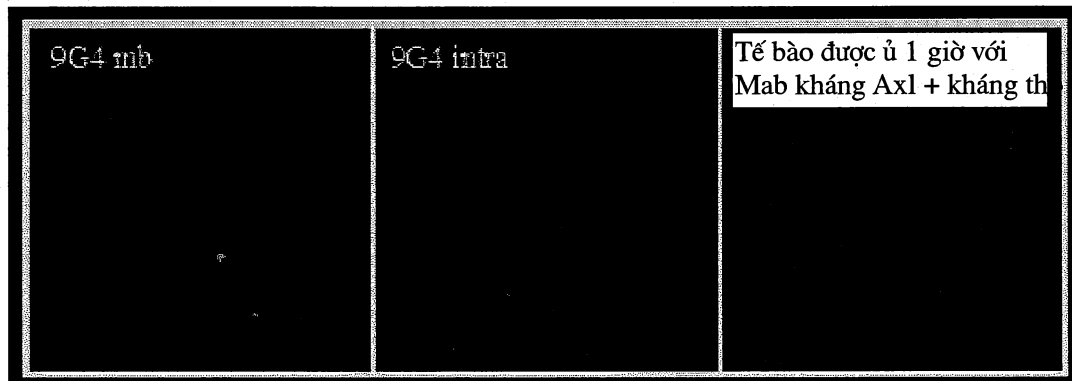


FIG. 9A

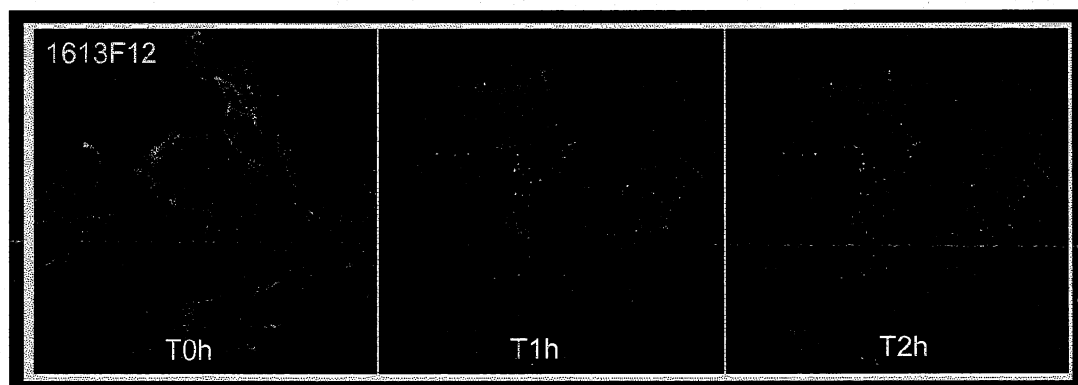


FIG. 9B



FIG. 9C

Thử nghiệm tăng sinh của tế bào SN12C dưới tác dụng của 1613F12

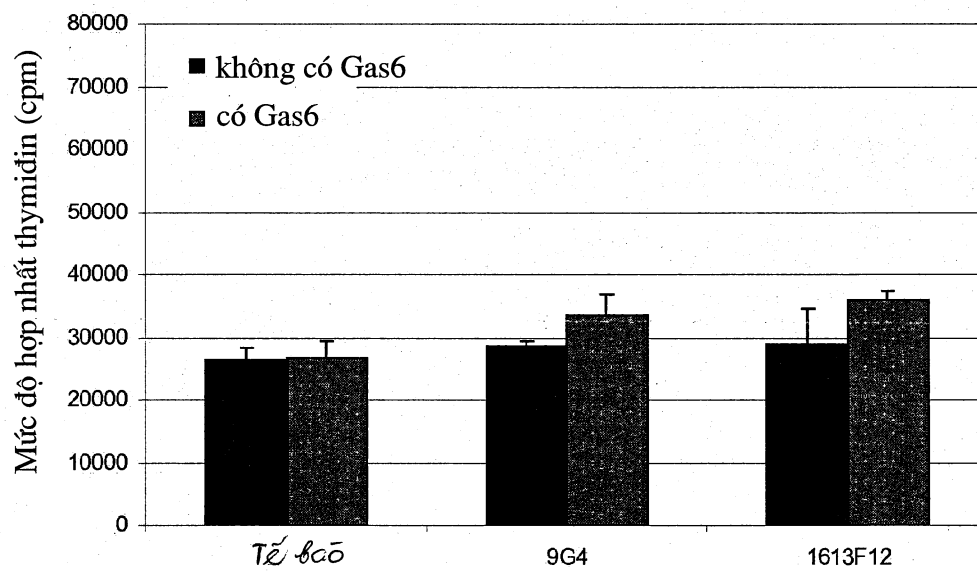


FIG. 10

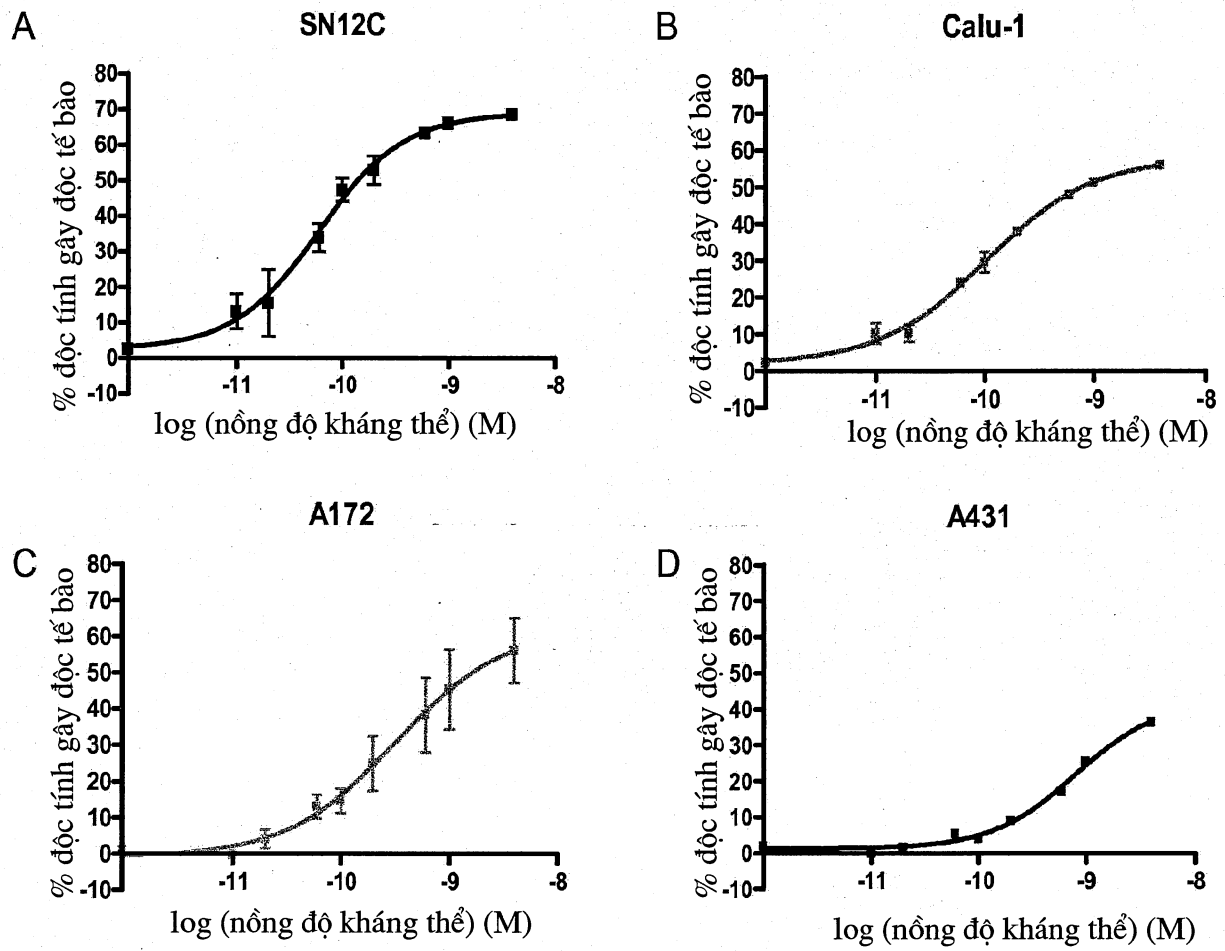


FIG. 11A-11D

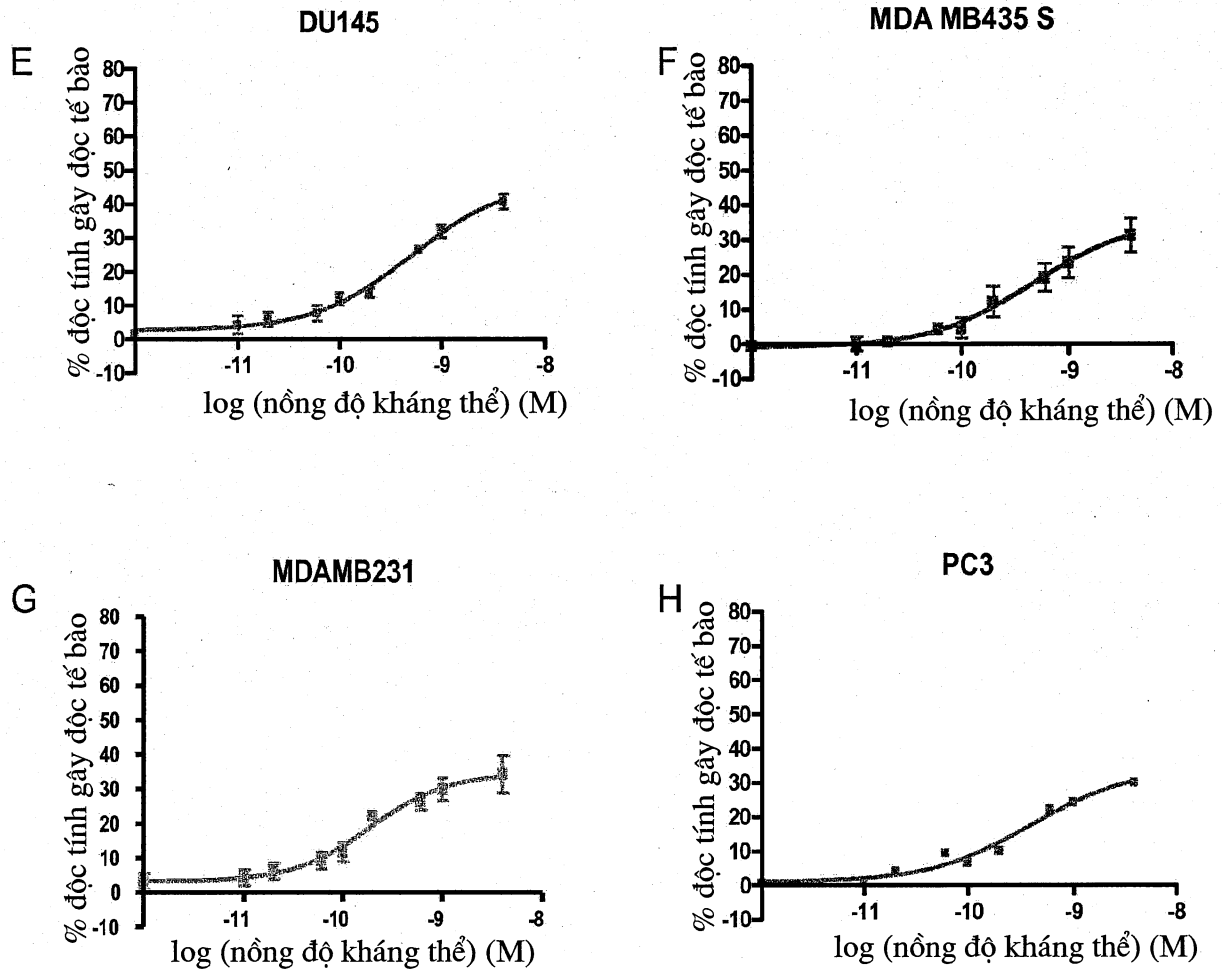


FIG. 11E-11H

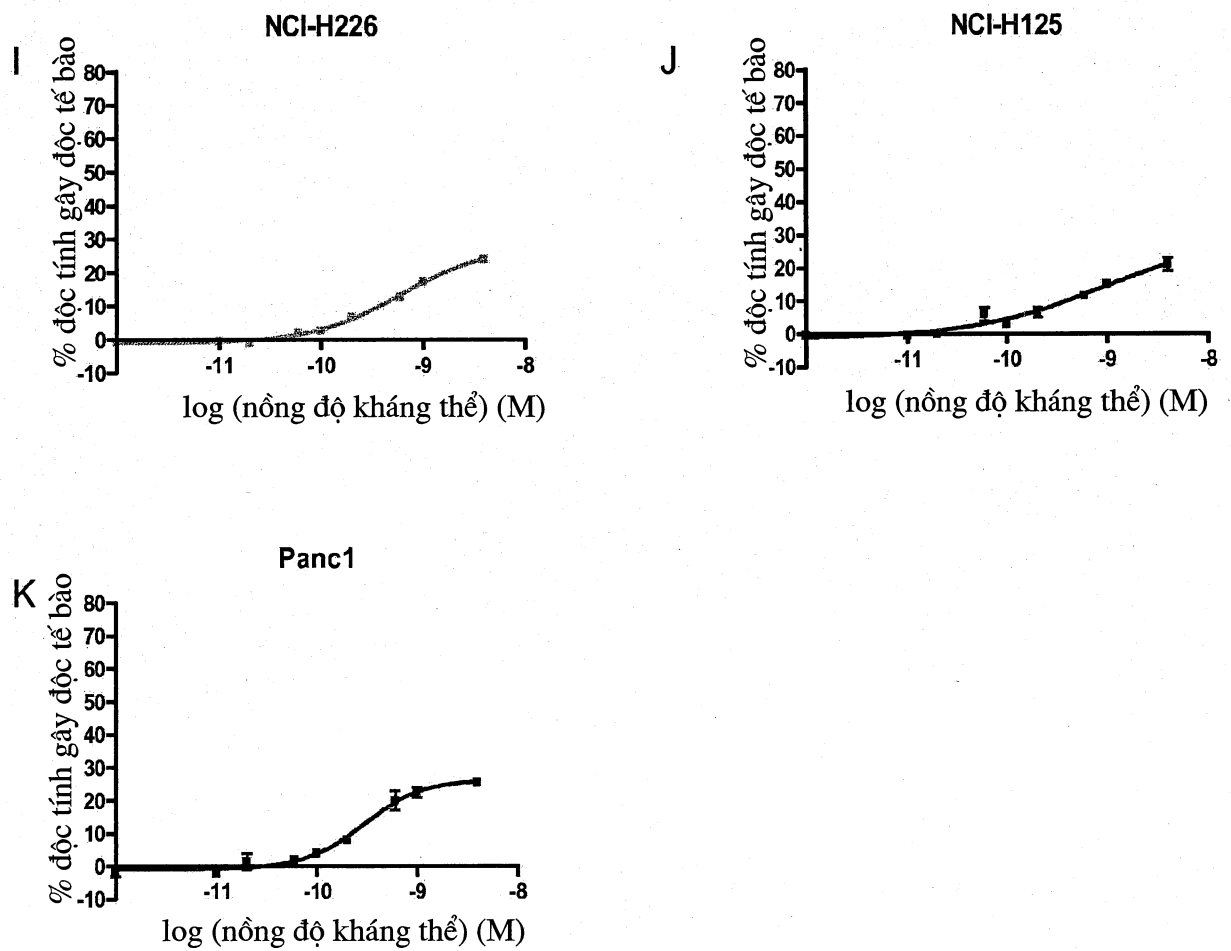


FIG. 11I-11K

Đánh giá kháng thể Axl 1613F12 được làm tương thích với người bằng ELISA

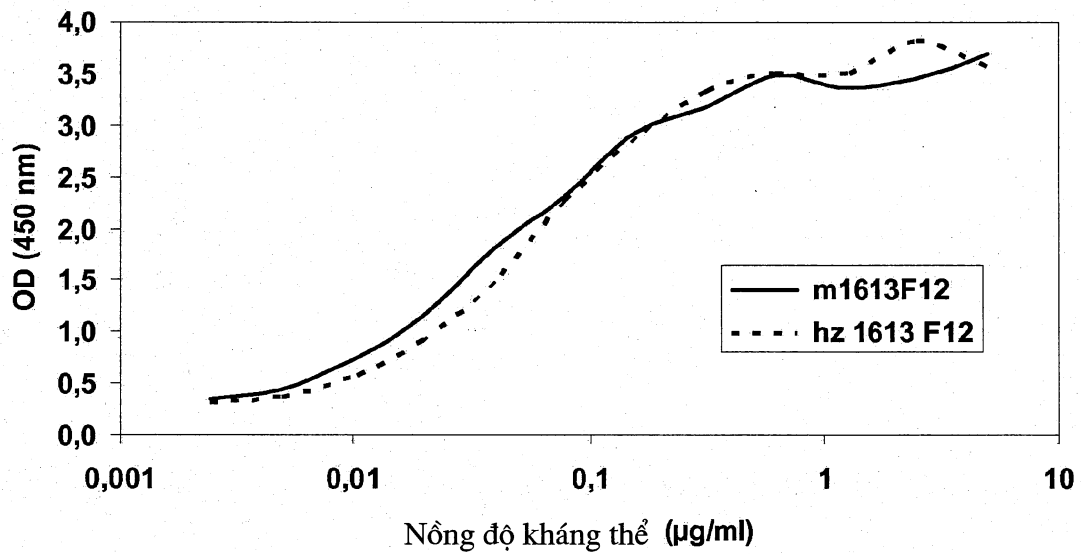
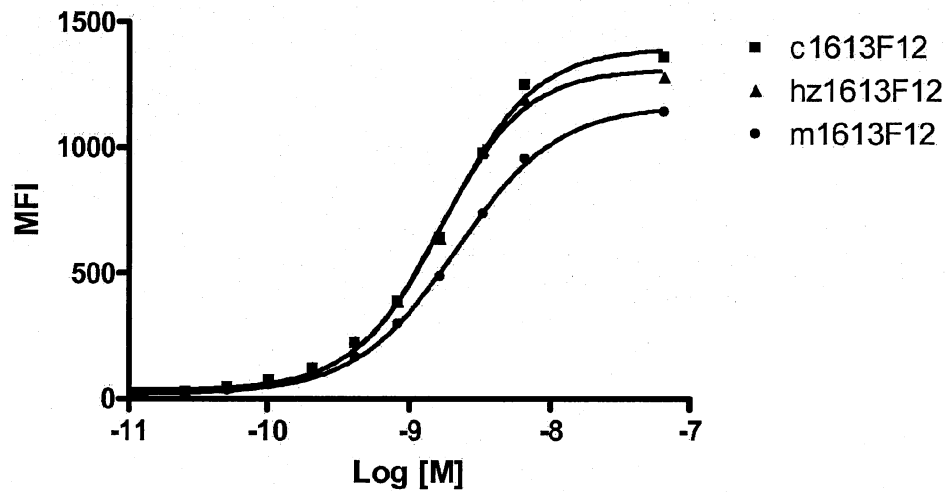


FIG. 12

Gắn kết trên các tế bào SN12C bằng máy đếm tế bào theo dòng



	EC50
c1613F12	1.810e-009
hz1613F12	1.638e-009
m1613F12	2.162e-009

FIG. 13

Độc tính gây độc tế bào in vitro của
m1613F12-sap, hz1613F12-sap,
m9G4-sap và ch9G4-sap ở SN12C

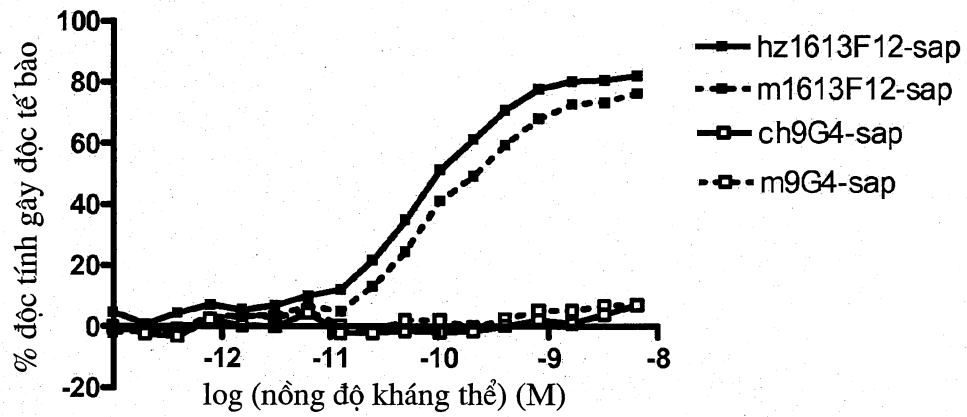


FIG. 14

Độc tính gây độc tế bào in vitro của m1613F12-sap,
hz1613F12-sap, m9G4-sap và ch9G4-sap ở các tế bào
Calu-1

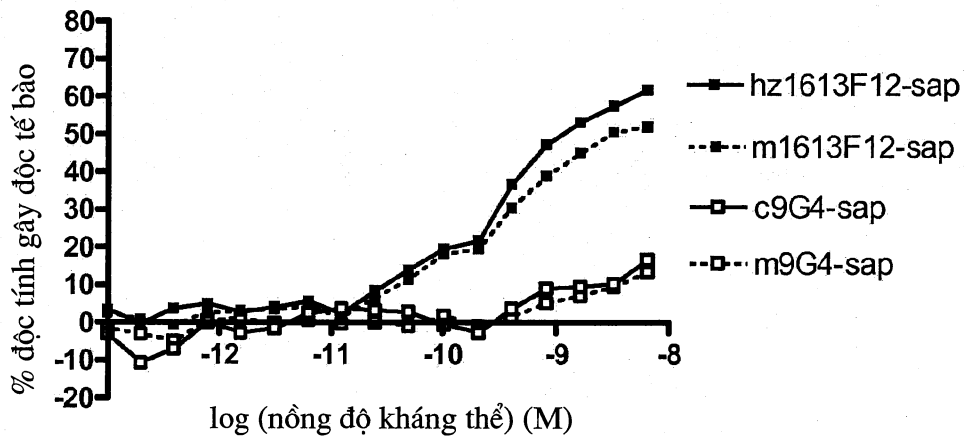


FIG. 15

Danh mục trình tự

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> Protein gắn kết kháng nguyên, tế bào lai, thể tiếp hợp miễn dịch và được
phẩm chứa thể tiếp hợp miễn dịch này

<130> 361629D30354

<140> PCT/EP2012/071833

<141> 2012/11/05

<150> EP 11306416.6

<151> 2011-11-03

<160> 99

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR-L1 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 1

Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
1 5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR-L2 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 2

Ser Gly Ser
1

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR-L3 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 3

Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR-H1 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 4

Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr Tyr
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR-H2 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 5

Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR-H3 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 6

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Mu của chuỗi nhẹ

<400> 7

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

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Mu của chuỗi nặng

<400> 8

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

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR-L1 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 9

Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR-L2 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 10

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR-L3 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 11

Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR-H1 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 12

Arg Asp Thr Tyr Ile His
 1 5

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

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR-H2 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 13

Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR-H3 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 14

Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR-L1 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 15
 aagagcatta gcaaatat

18

<210> 16
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR-L2 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 16
 tctggatcc

9

<210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR-L3 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 17
 caacagcatc atgaataccc gctcacg

27

<210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR-H1 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 18
 ggcttcaaca ttagagacac ctat

24

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR-H2 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 19
 cttgatcctg cgaatggtca tact

24

<210> 20
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR-H3 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo IMGT)

<400> 20

gctagagggg cctattacta cggtagtagt ggtctcttct actttgacta c

51

<210> 21

<211> 321

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Mu của chuỗi nhẹ

<400> 21

gatgtccaga taaccagtc tccatcttat ctgtctacat ctctggaga aaccattact

60

attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggatatca agaaaaacct

120

gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg agttccatca

180

aggttcagtg gcagtggatc tggtagagat ttcactctca ccatcagtag cctggagcct

240

gaagattttg caatgtattt ctgtcaacag catcatgaat acccgctcac gttcggtgct

300

gggaccgagc tggagctgaa a

321

<210> 22

<211> 372

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Mu của chuỗi nặng

<400> 22

gaggttcacc tgcagcagtc tggggcagag ctgtggaagc caggggcctc agtcaagttg

60

tcctgcacag cttctggctt caacattaga gacacctata tccattgggt gaaacagagg

120

cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg ctgtatcctg cgaatggtca tactaaatat

180

ggcccgaact tccagggcag ggccactatg acatcagaca catcctocaa caaggcctac

240

ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagaggggcc

300

tattactacg gtagtagtg tctcttctac tttgactact ggggccaagg caccactctc

360

tcagtctcct ca

372

<210> 23

<211> 33

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ CDR-L1 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 23

agggcaagta agagcattag caaatattta gcc

33

<210> 24

<211> 21

<212> ADN

<213> nhân tạo

```

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR-L2 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 24
tctggatcca ctttgcaatc t                                     21

<210> 25
<211> 27
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR-L3 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 25
caacagcatc atgaataccc gctcacg                               27

<210> 26
<211> 18
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng CDR-H1 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 26
agagacacct atatccat                                       18

<210> 27
<211> 51
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng CDR-H2 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 27
aggcttgatc ctgcgaatgg tcatactaaa tatggcccgga acttccaggg c   51

<210> 28
<211> 45
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng CDR-H3 từ kháng thể 1613F12 (đánh số theo Kabat)

<400> 28
ggggcctatt actacggtag tagtgggtctc ttctactttg actac         45

<210> 29
<211> 894
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Protein Axl (có tín hiệu peptit)

<400> 29

```

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
 20 25 30
 Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
 35 40 45
 Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
 50 55 60
 Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
 85 90 95
 Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
 100 105 110
 Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
 115 120 125
 Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
 130 135 140
 Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
 165 170 175
 Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
 180 185 190
 His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
 195 200 205
 Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
 210 215 220
 Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
 225 230 235 240
 Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln
 260 265 270

Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
290 295 300

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
405 410 415

Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
420 425 430

Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
435 440 445

Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
450 455 460

Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
465 470 475 480

Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
485 490 495

Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
500 505 510

Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
515 520 525

Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560

Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590

Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605

Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620

His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640

Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
 645 650 655

Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
 660 665 670

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685

Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700

Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
 705 710 715 720

Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735

Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
 755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
 770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 30
<211> 869
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Protein Axl (không có tín hiệu peptit)

<400> 30

Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro
1 5 10 15

Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln
20 25 30

Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly
35 40 45

Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly
50 55 60

Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu
85 90 95

Gly His Gln Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly
100 105 110

Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn
115 120 125

Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val
130 135 140

Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 His Gly Pro Gln Arg Ser Leu His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser
 165 170 175
 Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg
 180 185 190
 Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu
 195 200 205
 Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu
 210 215 220
 Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser
 225 230 235 240
 Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu
 245 250 255
 Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly
 260 265 270
 Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser
 275 280 285
 Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro
 290 295 300
 Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn
 305 310 315 320
 Gly Ser Gln Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln
 325 330 335
 Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro
 340 345 350
 Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu
 355 360 365
 Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr
 370 375 380
 Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala
 385 390 395 400
 Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro
 405 410 415

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala
420 425 430

Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His
435 440 445

Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val
450 455 460

Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser
465 470 475 480

Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu
485 490 495

Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala
500 505 510

Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly
515 520 525

Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met
530 535 540

Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu
545 550 555 560

Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile
565 570 575

Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val
580 585 590

Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu
595 600 605

Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu
610 615 620

Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr
625 630 635 640

Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn
645 650 655

Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile
660 665 670

Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val
675 680 685

Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys
690 695 700

Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg
705 710 715 720

Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr
725 730 735

Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly
740 745 750

Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg
755 760 765

Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala
770 775 780

Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp
785 790 795 800

Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp
805 810 815

Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala
820 825 830

Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr
835 840 845

Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly
850 855 860

Gln Glu Asp Gly Ala
865

<210> 31
<211> 451
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Miền ngoại bào của protein Axl (có tín hiệu peptit)

<400> 31

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
 35 40 45
 Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
 50 55 60
 Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
 85 90 95
 Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
 100 105 110
 Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
 115 120 125
 Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
 130 135 140
 Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
 165 170 175
 Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
 180 185 190
 His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
 195 200 205
 Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
 210 215 220
 Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
 225 230 235 240
 Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln
 260 265 270
 Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285
 Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
 290 295 300

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
405 410 415

Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
420 425 430

Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
435 440 445

Pro Trp Trp
450

<210> 32
<211> 426
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Miền ngoại bào của protein Axl (không có tín hiệu peptit)

<400> 32

Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro
1 5 10 15

Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln
20 25 30

Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly
35 40 45

Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly
50 55 60

Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu
 85 90 95
 Gly His Gln Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly
 100 105 110
 Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn
 115 120 125
 Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val
 130 135 140
 Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 His Gly Pro Gln Arg Ser Leu His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser
 165 170 175
 Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg
 180 185 190
 Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu
 195 200 205
 Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu
 210 215 220
 Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser
 225 230 235 240
 Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu
 245 250 255
 Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly
 260 265 270
 Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser
 275 280 285
 Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro
 290 295 300
 Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn
 305 310 315 320
 Gly Ser Gln Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln
 325 330 335

Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro
 340 345 350

Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu
 355 360 365

Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr
 370 375 380

Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala
 385 390 395 400

Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro
 405 410 415

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp
 420 425

<210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Tetrapeptit

<400> 33

Gly Phe Leu Gly
 1

<210> 34
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Tetrapeptit

<400> 34

Ala Leu Ala Leu
 1

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Pentapeptit

<400> 35

Pro Val Gly Val Val
 1 5

<210> 36
 <211> 107

<212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> X có thể thay thế I hoặc V

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X có thể thay thế M hoặc I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> X có thể thay thế S hoặc Y

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> X có thể thay thế S hoặc A

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> X có thể thay thế R hoặc T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> X có thể thay thế V hoặc I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> X có thể thay thế T hoặc N

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> X có thể thay thế Q hoặc E

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> X có thể thay thế V hoặc T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(44)
 <223> X có thể thay thế P hoặc N

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (87)..(87)
 <223> X có thể thay thế Y hoặc F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (100)..(100)
 <223> X có thể thay thế G hoặc A

<220>

<221> misc_feature
 <222> (103)..(103)
 <223> X có thể thay thế K hoặc E

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (104)..(104)
 <223> X có thể thay thế V hoặc L

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys
 100 105

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 44

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 46

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

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

<210>	47
<211>	107
<212>	PRT
<213>	nhân tạo

<220>
<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

<210>	48
<211>	124
<212>	PRT
<213>	nhân tạo

<220>
<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi năng

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> X có thể thay thế Q hoặc E
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> X có thể thay thế Q hoặc H
```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> X có thể thay thế V hoặc Q

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> X có thể thay thế V hoặc L

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> X có thể thay thế K hoặc V

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> X có thể thay thế V hoặc L

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> X có thể thay thế K hoặc T

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> X có thể thay thế M hoặc I

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> X có thể thay thế R hoặc K

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(48)
<223> X có thể thay thế M hoặc I

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> X có thể thay thế W hoặc R

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> X có thể thay thế N hoặc K

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> X có thể thay thế A hoặc G

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(72)
<223> X có thể thay thế R hoặc S

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> X có thể thay thế I hoặc S

<220>
<221> misc_feature
<222> (77)..(77)

```

<223> X có thể thay thế S hoặc N

<220>

<221> misc_feature

<222> (81)..(81)

<223> X có thể thay thế M hoặc L

<220>

<221> misc_feature

<222> (82)..(82)

<223> X có thể thay thế E hoặc Q

<400> 48

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

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

Tyr Xaa His Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45

Gly Xaa Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Xaa Tyr Xaa Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 49

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 50

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 51

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 52

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 53

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 53

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 54

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 55

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 55

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 56

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 57

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 58

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 59

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 60

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 61

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 62

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 62

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 63

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 64

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 65

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 124
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 66

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 124
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 67

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68

<211> 124

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 68

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Gly Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

 <400> 69
 gatattcaaa tgacacagtc tccaagctcc ctttctgcat cagtgggcga tagagtaacc 60
 atcacttgcc ggcgcagcaa aagcatctcc aaatacctcg cttggtacca gcagaagcca 120
 ggcaaggtcc ctaaactgct cttttattcc ggccagtacc tgcagtctgg ggtgccttct 180
 cggttcagtg gaagtggctc cgggtaccgac tttaccctga ctataagctc actccagccc 240
 gaggacgtcg ctacatatta ctgtcagcag caccatgaat atcctctgac attcggtgga 300
 ggaaccaagg tggagatcaa g 321

 <210> 70
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

 <400> 70
 gacgttcaaa tgacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca 60
 attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca 120
 ggcaaagtgc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct 180
 cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca 240
 gaggatgtcg ccacctacta ttgccagcag caccatgagt atcccctcac ctttgagggt 300
 ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

 <210> 71
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

 <400> 71
 gacatccaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca 60
 attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca 120
 ggcaaagtgc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct 180
 cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca 240
 gaggatgtcg ccacctacta ttgccagcag caccatgagt atcccctcac ctttgagggt 300
 ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

<210> 72
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 72
 gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca 60
 attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca 120
 ggcaaagtgc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct 180
 cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttactctga ctatcagctc tctgcagcca 240
 gaggatgtcg ccacctacta ttgccagcag caccatgagt atcccctcac ctttgagggt 300
 ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

<210> 73
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 73
 gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca 60
 attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca 120
 ggcaaaaccc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct 180
 cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttactctga ctatcagctc tctgcagcca 240
 gaggatgtcg ccacctacta ttgccagcag caccatgagt atcccctcac ctttgagggt 300
 ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

<210> 74
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 74
 gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca 60
 attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca 120
 ggcaaagtga acaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct 180
 cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttactctga ctatcagctc tctgcagcca 240
 gaggatgtcg ccacctacta ttgccagcag caccatgagt atcccctcac ctttgagggt 300
 ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

<210> 75
 <211> 321

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 75

gatgtgcaaa ttacacagtc tccaagctcc ctttctgcat cagtgggcga tagagtaacc	60
atcaactgcc gcgccagcaa aagcatctcc aaatacctcg cttggtacca gcagaagcca	120
ggcaaggtcc cttaaactgct catttattcc ggcagtaccc tgcagtctgg ggtgccttct	180
cggttcagtg gaagtggctc cggtagccgac tttaccctga ctataagctc actccagccc	240
gaggacgtcg ctacatattt ttgtcagcag caccatgaat atcctctgac attcgggtgga	300
ggaaccaagg tggagatcaa g	321

<210> 76

<211> 321

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 76

gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagtctc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca	60
attaactgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcaaaacca	120
ggcaaaaccc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct	180
cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca	240
gaggatgtcg ccacctactt ctgccagcag caccatgagt accccctcac ctttgagggt	300
ggcaccaaag tggaaatcaa g	321

<210> 77

<211> 321

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 77

gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagtctc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca	60
attaactgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca	120
ggcaaagtga acaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct	180
cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca	240
gaggatgtcg ccacctactt ctgccagcag caccatgagt accccctcac ctttgagggt	300
ggcaccaaag tggaaatcaa g	321

<210> 78

<211> 321

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 78

gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca 60
 attaaactgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca ggagaaacca 120
 ggcaaaacca acaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct 180
 cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca 240
 gaggatgtcg ccacctactt ctgccagcag caccatgagt accccctcac ctttggaggt 300
 ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

<210> 79

<211> 321

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nhẹ

<400> 79

gacgtccaga tcacacagtc tccttcctat ctggccgcct ctgtgggcga taccattacc 60
 ataaactgca gggcttcaaa gagcatcagc aagtacctgg catggtatca ggagaagccc 120
 gggaaaacca ataagctcct gatctactcc ggctctactt tgcagtcggg agtgcccagc 180
 cggttttcag gcagtggtag tggaactgac tttactctga ccattagctc tctgcaaccc 240
 gaagacgtag ctacatactt ctgtcagcag caccatgaat atccactgac cttcgggtgcc 300
 gggacagagc tggagatcaa a 321

<210> 80

<211> 372

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 80

caggtgcagc tgggtgcagag tgggtgctgag gtgaaaaagc ccggagcctc tgtcaaagtc 60
 tcttgtaagg catccgggtt taacatccgg gacacataca tgactgggt taggcaggct 120
 ccaggccagg gtctggaatg gatgggatgg cttgacctg ctaacggcca cactaattac 180
 gcccaaaagt ttcaggggcg cgtaaccatg accagagata ctagcatatc cactgcatac 240
 atggagctga gccgactccg tagcgacgat accgccgtgt attattgcgc aaggggagcc 300
 tattactacg gcagtagcgg actcttctac ttcgactatt gggggcaagg caccctggtc 360
 acagtttcat ca 372

<210> 81

<211> 372

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 81

caggttcagc	tcgttcagag	tggcgccgag	gtgaagaagc	ccggtgctag	tgtcaagggtg	60
tcctgcaaag	ccagcgggtt	caacatacgg	gatacctaca	ttcactgggt	gaggcaagcc	120
cctgggtcaag	gactggaatg	gatgggctgg	ctggaccag	caaacggcca	cacaaattac	180
gctcagaaat	tccaggggag	agtcaccatg	acccgggaca	cctcaatctc	cactgcatac	240
atggagcttt	ctcgcttgag	gagtgatgac	acagctgtgt	attattgtgc	cagaggagca	300
tactattatg	gatcttccgg	cctgttctac	tttgactact	gggggcaggg	aaccttggtc	360
acagtgaagct	ca					372

<210> 82

<211> 372

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 82

caggttcagc	tcgttcagag	tggcgccgag	gtgaagaagc	ccggtgctag	tgtcaagggtg	60
tcctgcaaag	ccagcgggtt	caacatacgg	gatacctaca	tgactgggt	gaggcaagcc	120
cctgggtcaag	gactggaatg	gatgggcagg	ctggaccag	caaacggcca	cacaaaatac	180
gctcagaaat	tccaggggag	agtcaccatg	acccgggaca	cctcaatctc	cactgcatac	240
atggagcttt	ctcgcttgag	gagtgatgac	acagctgtgt	attattgtgc	cagaggagca	300
tactattatg	gatcttccgg	cctgttctac	tttgactact	gggggcaggg	aaccttggtc	360
acagtgaagct	ca					372

<210> 83

<211> 372

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 83

caggttcagc	tcgttcagag	tggcgccgag	gtgaagaagc	ccggtgctag	tgtcaagggtg	60
tcctgcaaag	ccagcgggtt	caacatacgg	gatacctaca	tgactgggt	gaggcaagcc	120
cctgggtcaag	gactggaatg	gatgggctgg	ctggaccag	caaacggcca	cacaaattac	180
gctcagaaat	tccaggggag	agtcaccatg	acccgggaca	cctcaagctc	cactgcatac	240
atggagcttt	ctcgcttgag	gagtgatgac	acagctgtgt	attattgtgc	cagaggagca	300
tactattatg	gatcttccgg	cctgttctac	tttgactact	gggggcaggg	aaccttggtc	360
acagtgaagct	ca					372

<210> 84
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 84
 caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg 60
 tcctgcaaag ccagcggggtt caacatacgg gatacctaca tgcactgggt gaggcaagcc 120
 cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaatcaa cactgcatac 240
 atggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttcgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgaact ca 372

<210> 85
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 85
 caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg 60
 tcctgcaaag ccagcggggtt caacatacgg gatacctaca tgcactgggt gaggcaagcc 120
 cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac 240
 atggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttcgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgaact ca 372

<210> 86
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 86
 caggtgcagc tgggtgcagag tgggtgctgag gtgaaaaagc ccggagcctc tgtcaaagtc 60
 tcttgtaagg catccgggtt taacatccgg gacacataca tacactgggt taggcaggct 120
 ccaggccagg gtctggaatg gatgggatgg cttgaccctg ctaacggcca cactaattac 180
 gccc aaaagt ttcagggggc cgtaaccatg accagagata ctactccaa tactgcatac 240
 atggagctga gccgactccg tagcgacgat accgccgtgt attattgcgc aaggggagcc 300
 tattactacg gcagtagcgg actcttctac ttgactatt gggggcaagg caccctgggtc 360

acagtttcat ca

372

<210> 87
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 87
 caggttcacc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaaggtg 60
 tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggaagcc 120
 cctggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac 180
 gtcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac 240
 atggagcttt ctgccttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttcgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgaact ca 372

<210> 88
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 88
 caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaaggtg 60
 tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggaagcc 120
 cctggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaattac 180
 gtcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac 240
 atggagcttt ctgccttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttcgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgaact ca 372

<210> 89
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 89
 caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaaggtg 60
 tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggaagcc 120
 cctggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac 180
 gtcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac 240

atggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
tactattatg gatcttccgg cctgtttctac tttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
acagtgagct ca 372

<210> 90
<211> 372
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 90
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaaggtg 60
tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggcaagcc 120
cctgggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac 180
gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac 240
atggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
tactattatg gatcttccgg cctgtttctac tttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
acagtgagct ca 372

<210> 91
<211> 372
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 91
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaaggtg 60
tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggcaagcc 120
cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac 180
gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac 240
atggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
tactattatg gatcttccgg cctgtttctac tttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
acagtgagct ca 372

<210> 92
<211> 372
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> Miễn thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 92
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaaggtg 60
tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggcaagcc 120

cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac 240
 atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgaact ca 372

<210> 93
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 93
 caggtgcatc tgggtgcagag tgggtgctgag gtgaaaaagc ccggagcctc tgtcaaagtc 60
 tcttctaagg catccgggtt taacatccgg gacacataca tacactgggt taggcaggct 120
 ccaggccagg gtctggaatg gatgggatgg cttgaccctg ctaacggcca cactaagtac 180
 gcccaaaaagt ttcaggggag cgtaaccatg acctctgata ctagctocaa tactgcatac 240
 atggagctga gccgactccg tagcgacgat accgccgtgt attattgcgc aaggggagcc 300
 tattactacg gcagtagcgg actcttctac ttgactatt gggggcaagg caccctggtc 360
 acagtttcat ca 372

<210> 94
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 94
 caggttcacc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg 60
 tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggcaagcc 120
 cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac 240
 ctggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgaact ca 372

<210> 95
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 95
 caggttcagc tccagcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagctg 60
 tcctgcaccg ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggaagcc 120
 cctggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac 240
 atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgagct ca 372

<210> 96
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 96
 caggttcagc tccagcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagctg 60
 tcctgcaccg ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggaagcc 120
 cctggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac 240
 atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgagct ca 372

<210> 97
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 97
 caggttcacc tccagcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagctg 60
 tcctgcaccg ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggaagcc 120
 cctggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac 240
 atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca 300
 tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc 360
 acagtgagct ca 372

<210> 98
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 98

caggttcagc tccagcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagctg	60
tcctgcaccg ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca ttcactgggt gaggaagcc	120
cctgggtcaag gactggaatg gatcggcagc ctggaCccag caaacggcca cacaaagtac	180
gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagCgaca cctcaagcaa cactgcatac	240
ctggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca	300
tactattatg gatcttcogg cctgttctac tttgaCtact gggggcaggg aaccttggtc	360
acagtgaagt ca	372

<210> 99

<211> 372

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền thay đổi Hz của chuỗi nặng

<400> 99

gaagttcact tgcagcagtc aggcgccgag cttgtgaaac ctggagccag cgtcaaactg	60
tcctgtaccg ctagtggatt caatattcgg gacacctata tccactgggt aaagcaagca	120
ccagggcagg gattggagtg gatcggacgc ctggatcccg ccaacgggtca tactaagtac	180
ggtcagaagt tccaagggag ggtgacaatg acctctgata ccagctccaa caccgcatat	240
ctgcagctga gccgtcttag atctgacgac acagctgtct actattgcgc taggggcgcc	300
tactactaag ggtccagtgg tctgttttac ttcgattatt ggggccaggg cactctcgtg	360
acagtgtcaa gt	372