



(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)



1-0026048

(51)⁷ C07K 16/40

(13) B

(21) 1-2013-00715

(22) 09/08/2011

(86) PCT/EP2011/063648 09/08/2011

(87) WO/2012/020006 16/02/2012

(30) 10172842.6 13/08/2010 EP

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/07/2013 304A

(73) ROCHE GLYCART AG (CH)

Wagistrasse 18 CH-8952 Schlieren (CH)

(72) BACAC, Marina (IT); FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER, Anne (CH); HOSSE, Ralf (DE); KLEIN, Christian (DE); MOESSNER, Ekkehard (DE); NICOLINI, Valeria G. (ES); UMANA, Pablo (CR).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN KÍCH HOẠT NGUYÊN BÀO SỢI VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng gắn kết đặc hiệu với protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP) và phương pháp tạo ra kháng thể này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ sản xuất kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đặc hiệu cho protein kích hoạt nguyên bào sợi (fibroblast activation protein: FAP). Ngoài ra, sáng chế liên quan đến các polynucleotit mã hóa các kháng thể này và các vector và các tế bào chủ bao gồm các polynucleotit này. Sáng chế còn liên quan đến các phương pháp tạo ra các kháng thể và các phương pháp sử dụng chúng trong việc điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP) và kháng FAP các kháng thể kháng FAP

Protein kích hoạt nguyên bào sợi người (FAP; số truy cập GenBank AAC51668), còn được gọi là Seprase, là một màng tích phân 170 kDa peptidaza serin (EC 3,4,21.B28). Cùng với dipeptidyl peptidaza IV (còn được gọi là CD26; số truy cập GenBank P27487), một enzym bề mặt tế bào liên kết chặt chẽ, và các peptidaza khác, FAP thuộc họ dipeptidyl peptidaza IV (Yu et al, FEBS J 277, 1126-1144 (2010)). Nó là một homodime có chứa hai tiểu đơn vị N-glycosyl hóa với một miền ngoại bào đầu C lớn, trong đó miền xúc tác của enzym được định vị (Scanlan et al., Proc Natl Acad Sci USA 91, 5657-5661 (1994)). FAP, ở dạng glycosyl hóa của nó, có cả hai hoạt động dipeptidyl peptidaza hậu prolyl và gelatinaza (Sun et al., Protein Expr Purif 24, 274-281 (2002)).

FAP người ban đầu được xác định trong các nguyên bào sợi được nuôi cấy bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng (mAb) F19 (được mô tả trong WO 93/05804, ATCC số HB 8269). Các chất đồng đẳng của protein được phát hiện thấy ở một số loài, bao gồm cả chuột (Niedermeyer et al., Int J Cancers 71, 383-389 (1997), Niedermeyer et al., Eur J Biochem 254, 650-654 (1998); số truy cập

GenBank AAH19190). FAP có sự phân bố mô duy nhất: biểu hiện của nó được tìm thấy được sửa lại hoàn toàn cao trên các nguyên bào sợi mô đệm phản ứng của hơn 90% của tất cả các khối u biểu mô di căn và sơ cấp, bao gồm cả các ung thư biểu mô phổi, đại trực tràng, bàng quang, buồng trứng và vú, trong khi nó thường không có ở các mô người trưởng thành bình thường (Rettig et al., Proc Natl Acad Sci USA 85, 3110-3114 (1988); Garin-Chesa et al., Proc Natl Acad Sci USA 87, 7235-7239 (1990)). Các báo cáo tiếp theo cho thấy rằng FAP không chỉ được biểu hiện ở các nguyên bào sợi đệm mà còn ở một số loại tế bào ác tính của gốc biểu mô, và FAP biểu hiện tương quan trực tiếp với các kiểu hình ác tính (Jin et al., Anti-cancers Res 23, 3195-3198 (2003)).

Do biểu hiện của nó ở nhiều bệnh ung thư phổ biến và biểu hiện hạn chế của nó ở các mô bình thường, FAP đã từng được coi là một kháng nguyên đích đầy hứa hẹn để hình dung, chẩn đoán và điều trị nhiều loại ung thư biểu mô khác nhau. Vì vậy, nhiều kháng thể đơn dòng đã được tăng kháng FAP cho mục đích nghiên cứu, chẩn đoán và điều trị.

Sibrotuzumab/BIBH1, một phiên bản được làm tương thích với người của kháng thể F19 mà gắn kết đặc hiệu với FAP người (được mô tả trong WO 99/57151), và còn được làm tương thích với người hoặc toàn bộ các kháng thể người kháng kháng nguyên FAP với epitop F19 đặc hiệu (được mô tả trong Mersmann et al., Int J Cancer 92, 240-248 (2001); Schmidt et al., Eur J Biochem 268, 1730-1738 (2001); WO 01/68708)) đã được phát triển. Kháng thể OS4 là một phiên bản được làm tương thích với người khác (CDR-ghép) của kháng thể F19 (Wüest et al., J Biotech 92, 159-168 (2001), trong khi scFv 33 và scFv 36 có đặc hiệu gắn kết khác với F19 và là phản ứng ngang cho protein FAP người và chuột (Brocks et al., Mol Med 7, 461-469 (2001)). Gần đây nhất, các kháng thể kháng FAP chuột khác, cũng như các phiên bản dạng khảm và được làm tương thích với người của chúng, đã được phát triển (WO 2007/077173, Ostermann et al., Clin Cancers Res 14, 4584-4592 (2008)).

Các proteaza trong đệm khối u, thông qua sự thủy phân protein của các thành phần thể mẹ ngoại bào (ECM), tạo điều kiện thuận lợi cho các quá trình như sự hình thành mạch và/hoặc sự di cư tế bào khối u. Hơn nữa, đệm khối u đóng một vai trò quan trọng về cung cấp oxy và dinh dưỡng của các khối u, cũng như đối với sự lan rộng và di căn khối u. Các chức năng cần thiết này làm cho nó không chỉ là đích chẩn đoán mà còn là đích điều trị tiềm năng.

Bằng chứng về tính khả thi của các khái niệm về đệm khối u đạt được bằng *in vivo* nhờ sử dụng các kháng thể kháng FAP đã thu được trong nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I với kháng thể F19 được gắn nhãn ^{131}I , trong đó đã chứng minh được sự làm giàu đặc hiệu của kháng thể trong các khối u và phát hiện các di căn (Welt et al., J Clin Oncol 12, 1193-1203 (1994)). Tương tự, nghiên cứu giai đoạn I với sibrotuzumab đã chứng minh được sự tích lũy khối u đặc hiệu của kháng thể được gắn nhãn ^{131}I (Scott et al., Clin Cancers Res 9, 1639-1647 (2003)). Một thử nghiệm đầu giai đoạn II của sibrotuzumab không tiếp hợp ở các bệnh nhân bị ung thư đại trực tràng di căn, tuy nhiên, đã được ngưng do sự thiếu hiệu quả của các kháng thể về ức chế sự tiến triển của khối u (Hofheinz et al., Onkologie 26, 44-48 (2003)). Cũng là một kháng thể kháng FAP được phát triển gần đây không cho thấy các tác dụng kháng khối u *in vivo* ở dạng không tiếp hợp (WO 2007/077173).

Như vậy, vẫn còn có nhu cầu về tiếp cận điều trị tăng cường, bao gồm cả các kháng thể với hiệu quả được cải thiện, nhắm tới FAP để điều trị các bệnh ung thư.

Glycosyl hóa kháng thể

Thành phần oligosacarit có thể ảnh hưởng đáng kể đến các đặc tính có liên quan đến hiệu quả của glycoprotein điều trị, bao gồm cả tính ổn định lý học, kháng tấn công proteaza, tương tác với hệ miễn dịch, dược động học, và các hoạt động sinh học cụ thể. Các đặc tính này có thể phụ thuộc không chỉ vào sự có mặt hay vắng mặt, mà còn vào các cấu trúc cụ thể của các oligosacarit. Một

vài sự khái quát hóa oligosacarit giữa cấu trúc và chức năng glycoprotein có thể được thực hiện. Ví dụ, các cấu trúc oligosacarit nhất định làm trung gian giải phóng nhanh của glycoprotein từ dòng máu trong cơ thể thông qua sự tương tác với cacbohydrat cụ thể gắn kết các protein, trong khi các cấu trúc khác có thể được gắn kết bằng các kháng thể và kích hoạt các phản ứng miễn dịch không mong muốn (Jenkins et al., *Nature Biotechnol* 14, 975-81 (1996)).

Các kháng thể typ IgG1 là các kháng thể được sử dụng phổ biến nhất trong điều trị miễn dịch ung thư, là các glycoprotein có vị trí glycosyl hóa liên kết N bảo toàn ở Asn 297 ở mỗi miền CH2. Hai phức hợp các oligosacarit hai râu được gắn kèm với Asn 297 được kẹp ở giữa các miền CH2, tạo thành các tiếp xúc mở rộng với khung polypeptit, và sự có mặt của chúng là cần thiết cho kháng thể để làm trung gian cho các chức năng phản ứng như gây độc trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Lifely et al., *Glycobiology* 5, 813-822 (1995); Jefferis et al., *Immunol Rev* 163, 59-76 (1998); Wright và Morrison, *Trends Biotechnol* 15, 26-32 (1997)). Các nghiên cứu kỹ thuật protein đã chỉ ra rằng FcγRs tương tác với vùng bản lề thấp của miền IgG CH2. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996). Tuy nhiên, gắn kết FcγR cũng yêu cầu sự có mặt của các oligosacarit trong vùng CH2. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996); Wright và Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31 (1997), đề xuất rằng hoặc cả oligosacarit và polypeptit đóng góp trực tiếp vào vị trí tương tác hoặc oligosacarit là cần thiết để duy trì cấu tạo polypeptit CH2 hoạt tính. Do đó, sự biến đổi về cấu trúc oligosacarit có thể được khám phá như một phương tiện để tăng ái lực của sự tương tác giữa IgG1 và FcγR, và để tăng hoạt tính ADCC của các IgG1.

Một cách để có được sự gia tăng mạnh về hiệu lực của kháng thể đơn dòng, là tăng cường chức năng tự nhiên của chúng, các chức năng phản ứng trung gian tế bào bằng cách sắp đặt thành phần oligosacarit của chúng như được mô tả trong Umaña et al., *Nat Biotechnol* 17, 176-180 (1999) và US 6,602,684 (WO

99/54342), nội dung được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Umaña và cộng sự cho thấy rằng biểu hiện quá mức của $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII), glycosyltransferaza xúc tác sự hình thành của các oligosacarit được cắt đôi, trong buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) các tế bào tăng đáng kể *in vitro* hoạt tính ADCC của các kháng thể được tạo ra trong các tế bào này. Biểu hiện quá mức của GnTIII trong quá trình sản xuất các dòng tế bào dẫn tới các kháng thể được nâng cao chất lượng trong các oligosacarit được cắt đôi, trong đó thông thường cũng không được fucosylat hóa và typ lai. Trong đó, còn với GnTIII, manosidaza II (ManII) được biểu hiện quá mức trong quá trình sản xuất các dòng tế bào, các kháng thể được nâng cao chất lượng trong các oligosacarit không được fucosylat hóa, được cắt đôi của typ phức hợp đã thu được (Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)). Cả hai typ của các kháng thể thể hiện ADCC được tăng cường mạnh mẽ, so với các kháng thể với các polysacarit chưa biến đổi, nhưng các kháng thể chỉ có trong đó phần lớn các polysacarit N là của typ phức hợp có khả năng gây ra tính gây độc phụ thuộc bổ sung đáng kể (Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)). Các thay đổi trong chế phẩm của cacbohydrat Asn 297 hoặc sự giới hạn của nó cũng ảnh hưởng đến sự gắn kết của kháng thể miền Fc với thụ thể Fc γ (Fc γ R) và protein C1q bổ sung, mà là quan trọng với DCC và CDC tương ứng (Umaña et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Davies et al., Biotechnol Bioeng 74, 288-294 (2001); Mimura et al., J Biol Chem 276, 45539-45547 (2001); Radaev et al., J Biol Chem 276, 16478-16483 (2001); Shields et al., J Biol Chem 276, 6591-6604 (2001); Shields et al., J Biol Chem 277, 26733-26740 (2002); Simmons et al., J Immunol Methods 263, 133-147 (2002)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế cung cấp các kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP), có ái lực cao và/hoặc chức năng phản ứng được tăng cường.

Theo một khía cạnh, sáng chế hướng tới kháng thể gắn kết đặc hiệu FAP, bao gồm ít nhất một (tức là, một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu) vùng xác định hỗ trợ (các CDR) nêu ra trong các SEQ ID NO 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 và 177. Theo một phương án, kháng thể bao gồm ba chuỗi nặng CDR (tức là, HCDR1, HCDR2, và HCDR3) và/hoặc ba chuỗi nhẹ CDR (tức là, LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 và 177. Theo một phương án cụ thể hơn, kháng thể bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể và/hoặc một vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể, cụ thể là cả hai vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, được chọn từ các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309 và 311. Theo một phương án, kháng thể bao gồm một vùng Fc, cụ thể là vùng Fc IgG. Theo một phương án nữa, kháng thể là toàn bộ độ dài kháng thể, cụ thể là kháng thể lớp IgG. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm một vùng ổn định kháng thể người. Theo một phương án, kháng thể là kháng thể người. Theo một phương án, kháng thể is được xử lý bằng glycogen để có các oligosacarit biến đổi trong vùng Fc. Theo một phương án kháng thể có tỷ lệ các oligosacarit không được fucosylat hóa và/hoặc được cắt đôi tăng trong

vùng Fc, so với một kháng thể không được xử lý bằng glycogen. Theo một phương án nữa, kháng thể có chức năng phản ứng tăng và/hoặc ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng. Theo một phương án cụ thể, chức năng phản ứng tăng là tính độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC) tăng. Theo một phương án khác, kháng thể gắn kết với FAP bằng giá trị K_D thấp hơn khoảng 1 μM , tốt hơn là thấp hơn khoảng 100 nM, tốt nhất là thấp hơn khoảng 1 nM hoặc thậm chí thấp hơn khoảng 0,1 nM. Theo một phương án, kháng thể là ái lực hoàn thiện. Theo một phương án, kháng thể gắn kết với FAP ở các mô người. Theo một phương án, kháng thể không gây ra sự đồng hóa của FAP.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế cũng hướng tới các polypeptit, các polynucleotit, các tế bào chủ, và các vector biểu hiện có liên quan đến các kháng thể. Theo một khía cạnh nữa, sáng chế liên quan đến các phương pháp tạo thành các kháng thể. Theo một khía cạnh nữa, sáng chế hướng tới các phương pháp sử dụng các kháng thể, cụ thể là để điều trị các bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP, như bệnh ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)-dựa vào các phân tích động học của các đoạn Fab kháng FAP ái lực hoàn thiện. Tập hợp dữ liệu động học xử lý đại diện cho 19G1 vô tính gắn kết với người (hu) FAP (A) và chuột (mu) FAP (B), cho 20G8 vô tính gắn kết với hu FAP (C), mu FAP (D) và cho 4B9 vô tính gắn kết với hu FAP (E) và mu FAP (F). Các đường phẳng biểu thị sự phù hợp chung của dữ liệu với mô hình tương tác 1:1.

Fig. 2 thể hiện SPR-dựa vào các phân tích động học của thành các đoạn Fab kháng FAP ái lực-đã trưởng. Tập hợp dữ liệu động học xử lý đại diện cho 5B8 vô tính gắn kết với hu FAP (A) và mu FAP (B), cho 5F1 vô tính gắn kết với hu FAP (C), mu FAP (D) và cho 14B3 vô tính gắn kết với hu FAP (E) và mu FAP (F). Các đường phẳng biểu thị sự phù hợp chung của dữ liệu với mô hình tương tác 1:1.

Fig. 3 thể hiện SPR-dựa vào các phân tích động học của các đoạn Fab kháng FAP ái lực-đã trưởng thành. Tập hợp dữ liệu động học xử lý đại diện cho 16F1 vô tính gắn kết với hu FAP (A) và mu FAP (B), cho 16F8 vô tính gắn kết với hu FAP (C), mu FAP (D) và cho O3C9 vô tính gắn kết với hu FAP (E) và mu FAP (F). Các đường phẳng biểu thị sự phù hợp chung của dữ liệu với mô hình tương tác 1:1.

Fig. 4 thể hiện SPR-dựa vào các phân tích động học của các đoạn Fab kháng FAP ái lực-đã trưởng thành. Tập hợp dữ liệu động học xử lý đại diện cho O2D7 vô tính gắn kết với hu FAP (A) và mu FAP (B), cho 28H1 vô tính gắn kết với hu FAP (C), mu FAP (D), xyno FAP (E) và cho 22A3 vô tính gắn kết với hu FAP (F), mu FAP (G) và Khỉ cynomolgus (xyno) FAP (H). Các đường phẳng biểu thị sự phù hợp chung của dữ liệu với mô hình tương tác 1:1.

Fig. 5 thể hiện SPR-dựa vào các phân tích động học của các đoạn Fab kháng FAP ái lực-đã trưởng thành. Tập hợp dữ liệu động học xử lý đại diện cho 29B11 vô tính gắn kết với hu FAP (A), mu FAP (B), xyno FAP (C) và cho 23C10 vô tính gắn kết với hu FAP (D), mu FAP (E) và xyno FAP (F). Các đường phẳng biểu thị sự phù hợp chung của dữ liệu với mô hình tương tác 1:1.

Fig. 6 thể hiện SPR-dựa vào các phân tích động học của các kháng thể FAP 3F2 (A), 4G8 (B) và 3D9 (C) kháng kháng FAP gắn kết như các đoạn Fab với người, chuột và khỉ cynomolgus FAP. Tập hợp dữ liệu động học xử lý được trình bày, các đường phẳng biểu thị sự phù hợp chung của dữ liệu với mô hình tương tác 1:1.

Fig. 7 thể hiện SPR-dựa vào các phân tích động học của các kháng thể kháng FAP 3F2 (A), 4G8 (B) và 3D9 (C) kháng FAP gắn kết như IgG người với người, chuột và khỉ cynomolgus FAP. Tập hợp dữ liệu động học xử lý được trình bày, các đường phẳng biểu thị sự phù hợp chung của dữ liệu với mô hình tương tác 1:1.

Fig. 8 thể hiện các hình ảnh đại diện của các mẫu ở người của (A) bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC) được đổi màu mô hóa học miễn dịch đối với FAP bằng cách sử dụng 2F3 kháng thể IgG2a chuột, (B) mô hóa học miễn dịch ung thư biểu mô tuyến đại tràng được đổi màu đối với FAP bằng cách sử dụng 2F3 kháng thể IgG2a chuột, (C) mô hóa học miễn dịch ung thư biểu mô tuyến đại tràng được đổi màu đối với FAP bằng cách sử dụng 3D9 kháng thể IgG2a chuột, và (D) mô hóa học miễn dịch ung thư biểu mô tuyến đại tràng được đổi màu đối với FAP bằng cách sử dụng 4G8 kháng thể IgG2a chuột. FAP được phát hiện trong đệm khối u trong tất cả các mẫu và bởi tất cả các kháng thể (các bảng bên trái), trong khi sự không đổi màu được quan sát đối với kháng thể đối chứng isotyp (các bảng bên phải).

Fig. 9 thể hiện gắn kết của các kháng thể kháng FAP IgG1 người với FAP được biểu hiện trên các tế bào HEK 293 ổn định được chuyển nạp với người (A) hoặc chuột (B) FAP, như được xác định bởi FACS.

Fig. 10 thể hiện gắn kết của các kháng thể kháng FAP IgG1 người với DPPIV (CD26) hoặc HER2 được biểu hiện trên các tế bào HEK 293 ổn định được chuyển nạp, như được xác định bởi FACS. Kháng thể kháng HER2 trastuzumab và kháng thể kháng CD26 đã được sử dụng làm đối chứng dương. Kháng thể thứ cấp, đối chứng IgG hoặc không có kháng thể ở tất cả (chỉ các tế bào) được sử dụng như các đối chứng âm.

Fig. 11 thể hiện gắn kết của các kháng thể kháng FAP IgG1 người với FAP trên các nguyên bào sợi người (dòng tế bào GM05389), như được xác định bởi FACS. Kháng thể thứ cấp hoặc không có kháng thể ở tổng thể được sử dụng làm đối chứng âm.

Fig. 12 thể hiện gắn kết của các kháng thể kháng FAP IgG1 người với các nguyên bào sợi người (dòng tế bào GM05389), các dòng tế bào khối u người khác nhau, hoặc các tế bào ổn định được chuyển nạp HEK 293 với FAP người, như được xác định bởi FACS.

Fig. 13 (A) và (B) biểu hiện các mức độ của FAP trên bề mặt của các nguyên bào sợi phổi GM05389 ở những thời điểm khác nhau sau khi nuôi cấy với các kháng thể kháng FAP IgG1 người 3F2 hoặc 4G8, như được xác định bởi FACS. Không có sự suy giảm đáng kể về các mức độ biểu hiện FAP, cho thấy sự đồng hóa của FAP, được quan sát. Riêng kháng thể thứ cấp được thể hiện như đối chứng âm.

Fig. 14 trình bày các hình ảnh miễn dịch huỳnh quang được đưa ra làm đại diện thể hiện màng huyết thanh đổi màu trên các nguyên bào sợi phổi GM05389 đã thu được sau khi gắn kết của kháng FAP IgG 4G8 trong 45 phút ở 4°C (A), trong 20 phút ở 37°C (B), trong 1 giờ ở 37°C (C) hoặc trong 6 giờ ở 37°C (D). Kháng thể GA101 kháng CD20 được sử dụng như sự đối chứng isotyp, thể hiện nền đổi màu. EEA1 gắn nhãn các hạt cơ quan nội bào trước. Lưu ý rằng sự tồn tại của màng huyết thanh bề mặt FAP đổi màu lên đến 6 giờ sau khi gắn kết kháng thể kháng FAP 4G8.

Fig. 15 thể hiện sự thanh lọc và sự phân tích của IgG người 28H1 kiểu đại. A) bước thanh lọc sắc ký ái lực Protein A. B) bước thanh lọc sắc ký loại trừ kích cỡ. C) phân tích SDS PAGE. D) sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích. Các quy trình thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig. 16 thể hiện sự thanh lọc và sự phân tích của IgG người 28H1 được xử lý bằng glycogen. A) bước thanh lọc sắc ký ái lực Protein A. B) bước thanh lọc sắc ký loại trừ kích cỡ. C) phân tích SDS PAGE. D) sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích. Các quy trình thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig. 17 thể hiện sự thanh lọc và sự phân tích của IgG người 29B11 kiểu đại. A) bước thanh lọc sắc ký ái lực Protein A. B) bước thanh lọc sắc ký loại trừ kích cỡ. C) phân tích SDS PAGE. D) sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích. Các quy trình thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig. 18 thể hiện sự thanh lọc và sự phân tích của IgG người 29B11 được xử lý bằng glycogen. A) bước thanh lọc sắc ký ái lực Protein A. B) bước thanh lọc

sắc ký loại trừ kích cỡ. C) phân tích SDS PAGE. D) sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích. Các quy trình thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig. 19 thể hiện sự thanh lọc và sự phân tích của IgG người 3F2 kiểu dại. A) bước thanh lọc sắc ký ái lực Protein A. B) bước thanh lọc sắc ký loại trừ kích cỡ. C) phân tích SDS PAGE. D) sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích. Các quy trình thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig. 20 thể hiện sự thanh lọc và sự phân tích của IgG người 3F2 được xử lý bằng glycogen. A) bước thanh lọc sắc ký ái lực Protein A. B) bước thanh lọc sắc ký loại trừ kích cỡ. C) phân tích SDS PAGE. D) sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích. Các quy trình thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig. 21 thể hiện sự thanh lọc và sự phân tích của IgG người 4G8 kiểu dại. A) bước thanh lọc sắc ký ái lực Protein A. B) bước thanh lọc sắc ký loại trừ kích cỡ. C) phân tích SDS PAGE. D) sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích. Các quy trình thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig. 22 thể hiện sự thanh lọc và sự phân tích của IgG người 4G8 được xử lý bằng glycogen. A) bước thanh lọc sắc ký ái lực Protein A. B) bước thanh lọc sắc ký loại trừ kích cỡ. C) phân tích SDS PAGE. D) sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích. Các quy trình thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1.

Fig. 23 thể hiện gắn kết của ái lực kháng thể kháng FAP đã trưởng thành 28H1 với FAP người lên các tế bào HEK293 so với gắn kết của kháng thể kháng FAP mẹ 4G8.

Fig. 24 thể hiện các kết quả của một thử nghiệm giải phóng LDH để kiểm tra ADCC trung gian bằng các kháng thể kháng FAP IgG 28H1 (ái lực hoàn thiện) và 4G8, 3F8 (mẹ) như kiểu dại (wt) và được xử lý bằng các phiên bản glycogen (ge), với HEK293-hFAP như là các tế bào đích và các PBMNCs như là các tế bào phản ứng (kiểu gen F/F FcγRIIIa).

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Các định nghĩa

“Khung người chấp nhận” cho các mục đích ở đây là khung bao gồm trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có nguồn gốc từ khung globulin miễn dịch người hoặc khung liên ứng người, như được xác định dưới đây. Một khung người chấp nhận “có nguồn gốc từ” khung globulin miễn dịch người hoặc khung liên ứng người có thể bao gồm cùng một trình tự axit amin của chúng, hoặc nó có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số các thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một số phương án, khung người chấp nhận VL là giống về trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch người VL hoặc trình tự khung liên ứng người.

“Ái lực” đề cập đến cường độ của tổng các tương tác không cùng hóa trị giữa một vị trí gắn kết đơn của một phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, một kháng nguyên). Trừ khi có các chỉ định khác, theo sáng chế, “ái lực gắn kết” đề cập đến ái lực gắn kết nội tại trong đó phản ánh sự tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của một phân tử X cho đối tác Y của nó nói chung có thể được đại diện bằng hằng số phân ly (K_D), là tỷ lệ phân ly và các hằng số tỷ lệ liên kết (k_{off} và k_{on} tương ứng). Nhờ đó, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tỷ lệ khác nhau, miễn là tỷ lệ của các hằng số tốc độ vẫn giữ nguyên. Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm cả các phương pháp được mô tả ở đây. Các phương án làm ví dụ và minh họa cụ thể để đo ái lực gắn kết được mô tả dưới đây.

Một kháng thể “ái lực hoàn thiện” đề cập đến kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi (ví dụ, các đột biến axit amin) ở một hoặc nhiều vùng siêu biến đổi (các HVR) (ví dụ, các CDR), so với kháng thể mẹ không có các thay đổi này, các

thay đổi này dẫn tới sự cải thiện về ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên. Điển hình là, kháng thể ái lực hoàn thiện gắn kết với cùng epitop như kháng thể mẹ.

Các thuật ngữ “kháng thể kháng FAP” và “kháng thể gắn kết với Protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP)” đề cập đến kháng thể có khả năng gắn kết FAP với ái lực đủ để kháng thể đó là hữu ích như một tác nhân chẩn đoán và/hoặc điều trị hướng đích FAP. Theo một phương án, mức độ gắn kết của kháng thể kháng FAP với một protein không FAP, không liên quan là ít hơn khoảng 10% gắn kết của kháng thể với FAP như được đo, ví dụ, bằng một thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc dòng phân tích tế bào (FACS). Theo một phương án, mức độ gắn kết của kháng thể kháng FAP theo sáng chế với DPPIV, một loại protein liên quan chặt chẽ đến FAP (còn được gọi là CD26; Số truy cập GenBank P27487), là ít hơn khoảng 15%, khoảng 10% hoặc khoảng 5% gắn kết của kháng thể với FAP như được đo bằng FACS. Theo các phương án bất kỳ, kháng thể gắn kết với FAP có hằng số phân ly (K_D) là $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001\text{ nM}$ (ví dụ, 10^{-8} M hoặc ít hơn, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo các phương án bất kỳ, kháng thể kháng FAP gắn kết với một epitop của FAP được bảo tồn trong số FAP từ các loài khác nhau.

Thuật ngữ "kháng thể" ở đây được sử dụng theo nghĩa rộng và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép), và các đoạn kháng thể miễn là chúng thể hiện hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn. Cũng được bao gồm là các đoạn kháng thể có vùng Fc, và các protein hợp nhất bao gồm vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch.

Một "đoạn kháng thể" đề cập đến một phân tử khác ngoài kháng thể còn nguyên vẹn bao gồm một phần của một kháng thể còn nguyên vẹn gắn kết

kháng nguyên mà kháng thể còn nguyên vẹn gắn kết. Các ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, các phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv), các mảnh kháng thể diame, và các kháng thể đa hiệu được tạo thành từ các đoạn kháng thể.

Một “kháng thể gắn kết với cùng epitop” như một kháng thể tham khảo đề cập đến kháng thể ngăn chặn gắn kết của kháng thể tham khảo với kháng nguyên của nó trong một thử nghiệm cạnh tranh bởi 50% hoặc nhiều hơn, và ngược lại, kháng thể tham khảo ngăn chặn gắn kết của kháng thể với kháng nguyên của nó trong một thử nghiệm cạnh tranh bởi 50% hoặc nhiều hơn. Một thử nghiệm cạnh tranh làm ví dụ được cung cấp ở đây.

Thuật ngữ "miền gắn kết kháng nguyên" đề cập đến một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm diện tích mà gắn kết đặc hiệu với và được bổ sung cho một phần hoặc toàn bộ của một kháng nguyên. Trường hợp một kháng nguyên là lớn, một phân tử gắn kết kháng nguyên chỉ có thể gắn kết với một phần cụ thể của kháng nguyên, trong đó một phần được gọi là một epitop. Một miền gắn kết kháng nguyên có thể được cung cấp bởi, ví dụ, một hoặc nhiều miền biến đổi của kháng thể (còn gọi là các vùng biến đổi kháng thể). Tốt hơn là, miền gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH).

Thuật ngữ kháng thể "dạng khảm" đề cập đến kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ một nguồn hoặc một loài khác. Đối với các kháng thể dạng khảm, ví dụ, các thành phần gắn kết không kháng nguyên có thể có nguồn gốc từ một loạt các loài, bao gồm cả các động vật linh trưởng như tinh tinh và người. Các kháng thể được làm tương thích với người là một dạng được ưu tiên đặc biệt của các kháng thể dạng khảm.

“Lớp” kháng thể đề cập đến loại miền ổn định hoặc vùng ổn định được chiếm giữ bởi chuỗi nặng của nó. Có năm lớp các kháng thể chính: IgA, IgD,

IgE, IgG, và IgM, và một vài trong số này có thể còn được chia thành các lớp phụ (các isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Các miền ổn định chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác nhau của các globulin miễn dịch được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ tương ứng.

Thuật ngữ "tác nhân gây độc" sử dụng ở đây đề cập đến một chất ức chế hoặc ngăn chặn chức năng tế bào và/hoặc gây ra chết hoặc phá hủy tế bào. Các tác nhân gây độc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đồng vị phóng xạ (ví dụ, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² và các đồng vị phóng xạ của Lu); các tác nhân hoặc các thuốc hóa trị liệu (ví dụ, methotrexat, adriamycin, các vinca alkaloid (vincristine, vinblastine, etoposid), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin hoặc các tác nhân trung gian khác); các tác nhân ức chế sự phát triển; các enzym và các đoạn của chúng như các enzym nucleolytic; các thuốc kháng sinh; các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố hoạt tính enzym của gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm cả các đoạn và/hoặc các biến thể của chúng; và các tác nhân kháng u hoặc kháng ung thư khác nhau được liệt kê dưới đây.

"Các chức năng phản ứng" đề cập đến các hoạt động sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, khác với isotyp kháng thể. Các ví dụ về các chức năng phản ứng kháng thể bao gồm: tính gây độc phụ thuộc (CDC) bổ sung và gắn kết C1q; thụ thể Fc gắn kết; tính độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC); thực bào; tiết cytokin; kháng nguyên trung gian phức hợp miễn dịch hấp thụ bởi các tế bào bạch cầu kháng nguyên; giảm quy định về các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và kích hoạt tế bào B.

Một "lượng hữu hiệu" của một tác nhân, ví dụ, một công thức dược, đề cập đến một lượng hữu hiệu, ở các liều và trong một giai đoạn thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng bệnh hoặc điều trị mong muốn.

Thuật ngữ "vùng Fc" được sử dụng ở đây để xác định một vùng đầu C của chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần của vùng ổn định. Thuật

ngữ này bao gồm trình tự các vùng Fc tự nhiên và các vùng Fc cải biến. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu cacboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lyzin đầu C (Lys447) của vùng Fc có thể có hoặc không có mặt. Trừ khi có quy định khác, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng ổn định là theo hệ thống đánh số EU, còn gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch" được dự kiến bao gồm các biến thể gen đẳng vị xuất hiện tự nhiên của vùng Fc của globulin miễn dịch cũng như các biến thể có các thay đổi, trong đó tạo ra những sự thay thế, sự bổ sung, hoặc loại bỏ nhưng chúng không làm giảm đáng kể khả năng của globulin miễn dịch để làm trung gian các chức năng phản ứng (như tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể). Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể loại bỏ khỏi đầu N hoặc đầu C của vùng Fc của globulin miễn dịch mà không làm giảm đáng kể chức năng sinh học. Các biến thể này có thể được chọn theo các nguyên lý chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để có hiệu quả tối thiểu về hoạt tính (xem, ví dụ, Bowie, J. U. et al., *Science* 247:1306-10 (1990)).

"Khung" hoặc "FR" đề cập đến các gốc miền biến đổi khác ngoài các gốc vùng siêu biến đổi (HVR) (hoặc CDR). FR của một miền biến đổi nói chung bao gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Theo đó, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện theo trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Các thuật ngữ "toàn bộ độ dài kháng thể," "kháng thể nguyên vẹn," và "toàn bộ kháng thể" được sử dụng thay thế cho nhau cùng đề cập đến kháng thể có cấu trúc tương tự đáng kể với cấu trúc kháng thể tự nhiên hoặc có các chuỗi nặng có chứa vùng Fc như được xác định ở đây.

Các thuật ngữ "tế bào chủ", "dòng tế bào chủ" và "nuôi cấy tế bào chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và đề cập đến các tế bào trong đó axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào, bao gồm cả dòng dõi của các tế bào này. Các tế bào chủ bao gồm "biến nạp" và "các tế bào cải biến" trong đó bao gồm tế bào cải biến sơ cấp và dòng dõi có nguồn gốc từ đó mà không liên quan đến số các đoạn. Dòng có thể không hoàn toàn giống hệt nhau trong axit nucleic từ một tế bào mẹ, nhưng có thể chứa các đột biến. Dòng đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như đã thử nghiệm hoặc được chọn trong tế bào cải biến gốc được bao gồm ở đây. Theo một phương án, tế bào chủ được xử lý để cho phép sản xuất kháng thể với các oligosacarit cải biến. Theo các phương án bất kỳ, các tế bào chủ còn được điều khiển để biểu hiện tăng các mức độ của một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII). Các tế bào chủ bao gồm các tế bào được nuôi cấy, ví dụ, các tế bào được nuôi cấy của động vật có vú, như các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NS0, các tế bào SP2/0, các tế bào u tủy YO, các tế bào u tủy chuột P3X63, các tế bào PER, các tế bào PER.C6 hoặc các tế bào tế bào lai, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, và các tế bào thực vật, để chỉ một vài, nhưng cũng bao gồm các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc mô thực vật hoặc động vật được nuôi cấy.

"Kháng thể người" là một trong những trạng thái có trình tự axit amin tương ứng với kháng thể được tạo ra bởi người hoặc tế bào người hoặc có nguồn gốc từ một nguồn không phải của người nhưng sử dụng các kho kháng thể người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể người khác. Định nghĩa về kháng thể người cụ thể là không bao gồm kháng thể được làm tương thích với người bao gồm các gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người.

"Khung liên ứng người" là khung đại diện cho các gốc axit amin thường xuất hiện nhất trong một sự chọn lọc của các trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch người. Nói chung, sự chọn lọc của các trình tự VL hoặc VH

globulin miễn dịch người là từ một nhóm phụ của các trình tự miền biến đổi. Nói chung, nhóm phụ của các trình tự là nhóm phụ như trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, nhóm phụ là nhóm phụ kapa I như trong Kabat et al., nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, nhóm phụ là nhóm phụ III như trong Kabat et al., nêu trên.

Kháng thể “được làm tương thích với người” đề cập đến kháng thể dạng khảm bao gồm các gốc axit amin từ các HVR không phải của người và các gốc axit amin từ các FR của người. Theo các phương án bất kỳ, kháng thể được làm tương thích với người sẽ bao gồm gần như toàn bộ của ít nhất một, và thường là hai miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như toàn bộ các HVR (ví dụ, các CDR) tương ứng với chúng của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc gần như toàn bộ của các FR tương ứng với chúng của kháng thể người. Kháng thể được làm tương thích với người có thể tùy ý bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể người. “Dạng được làm tương thích với người” của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, đề cập đến kháng thể đã được làm tương thích với người.

Thuật ngữ “vùng siêu biến đổi” hoặc “HVR”, theo sáng chế, đề cập đến từng vùng trong số các vùng của miền biến đổi của kháng thể là siêu biến đổi trong trình tự và/hoặc tạo thành các vòng xác định cấu trúc (“các vòng siêu biến đổi”). Nói chung, các kháng thể bốn chuỗi tự nhiên bao gồm sáu HVR; ba trong số VH (H1, H2, H3), và ba trong số VL (L1, L2, L3). Nói chung, các HVR bao gồm các gốc axit amin từ các vòng siêu biến đổi và/hoặc từ “các vùng xác định hỗ trợ” (các CDR), gần đây nhất là của khả năng biến đổi trình tự cao nhất và/hoặc có liên quan đến sự công nhận kháng nguyên. Với ngoại lệ của CDR1 trong VH, các CDR thường bao gồm các gốc axit amin tạo thành các vòng siêu biến đổi. Vùng biến đổi tăng (các HVR) cũng được đề cập đến như là các vùng

xác định hỗ trợ (các CDR), và các thuật ngữ này được sử dụng ở đây thay thế cho nhau trong việc tham khảo các phần của vùng biến đổi tạo thành các vùng gắn kết kháng nguyên. Vùng đặc biệt này đã được mô tả bởi Kabat et al., U.S. Dept. of Health và Người Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) và bởi Chothia et al, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), nơi các định nghĩa bao gồm sự chồng chéo hoặc các tập con của các gốc axit amin khi được so sánh với nhau. Tuy nhiên, ứng dụng của định nghĩa hoặc đề cập đến CDR của kháng thể hoặc các biến thể của chúng được dự kiến nằm trong phạm vi của thuật ngữ như đã xác định và được sử dụng ở đây. Các gốc axit amin thích hợp trong đó bao gồm các CDR như được xác định bằng mỗi trong số các tài liệu tham khảo dẫn chứng được đưa ra dưới đây trong Bảng 1 như một sự so sánh. Các số gốc chính xác trong đó bao gồm một CDR cụ thể sẽ khác nhau phụ thuộc vào trình tự và kích cỡ của CDR. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật thường có thể xác định các gốc trong đó bao gồm một CDR cụ thể dựa vào trình tự vùng biến đổi axit amin của kháng thể.

Bảng 1. Các định nghĩa¹ CDR

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ Việc đánh số của tất cả các định nghĩa CDR trong Bảng 1 theo thông lệ đánh số được đưa ra bởi Kabat et al. (xem dưới đây).

² "AbM" với một trường hợp thấp hơn "b" được sử dụng trong Bảng 1 đề cập đến các CDR như được xác định bằng phần mềm mẫu kháng thể "AbM" của Oxford Phân tử.

Kabat và cộng sự cũng đã xác định hệ thống đánh số cho các trình tự vùng biến đổi có thể áp dụng cho kháng thể bất kỳ. Một trong số những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể chỉ định rõ ràng hệ thống này của "việc đánh số Kabat" cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, mà không phụ thuộc vào dữ liệu thử nghiệm bất kỳ ngoại trừ trình tự của chính nó. Theo sáng chế, "việc đánh số Kabat" đề cập đến hệ thống đánh số được đưa ra bởi Kabat et al., U.S. Dept. of Health và Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi có các quy định cụ thể khác, các tham khảo việc đánh số của các vị trí gốc axit amin cụ thể trong vùng biến đổi kháng thể là theo hệ thống đánh số Kabat.

Các CDR cũng bao gồm "các gốc xác định đặc hiệu," hoặc "các SDR" đó là các gốc tiếp xúc kháng nguyên. Các SDR được chứa trong các vùng của các CDR được gọi là các CDR được làm ngắn, hoặc các CDR. Nói chung, chỉ một phần năm đến một phần ba của các gốc trong một CDR nhất định tham gia vào việc gắn kết kháng nguyên. Các các gốc xác định đặc hiệu trong một CDR cụ thể có thể được xác định bằng, ví dụ, sự ước tính về các tiếp xúc tồn tại giữa các nguyên tử từ mô hình ba chiều và việc xác định trình tự biến đổi ở một vị trí gốc nhất định phù hợp với các phương pháp được mô tả trong Padlan et al., FASEB J. 9(1):133-139 (1995). Các a-CDR làm ví dụ (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, và a-CDR-H3) xảy ra ở các gốc axit amin 31-34 của L1, 50-55 của L2, 89-96 của L3, 31-35B của H1, 50-58 của H2, và 95-102 của H3 (xem Almagro và Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008).)

"Thế tiếp hợp kháng thể" là kháng thể được tiếp hợp với một tác nhân gây độc.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các động vật nuôi (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó và ngựa), các động vật linh trưởng (ví dụ, người và các động vật linh trưởng không

phải là người như khi), thỏ, và các động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo các phương án bất kỳ, cá thể hoặc đối tượng là người.

Kháng thể "phân lập" là một trong số các kháng thể đã được tách ra khỏi thành phần của môi trường tự nhiên. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế để có độ tinh sạch lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bởi, ví dụ, các phương pháp điện di (ví dụ, SDS-PAGE, điểm đẳng điện (IEF), điện di mao mạch) hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi ion hoặc sắc ký pha đảo HPLC). Để xem xét các phương pháp để đánh giá về độ tinh sạch của kháng thể, xem, ví dụ, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

Polynucleotit "phân lập" đề cập đến một phân tử polynucleotit đã được tách ra khỏi các thành phần trong môi trường tự nhiên của nó. Polynucleotit phân lập bao gồm một phân tử polynucleotit được chứa trong các tế bào thông thường có chứa các phân tử polynucleotit, nhưng phân tử polynucleotit có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở một vị trí nhiễm sắc thể khác so với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

“Polynucleotit phân lập mã hóa kháng thể kháng FAP” đề cập đến một hoặc nhiều phân tử polynucleotit mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc các đoạn của chúng), bao gồm cả các phân tử polynucleotit này trong một vector đơn hoặc các vector riêng biệt, và các phân tử polynucleotit này có mặt ở một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" theo sáng chế đề cập đến kháng thể đã thu được từ một mức độ phân bố của các kháng thể đồng nhất đáng kể, tức là, các kháng thể cá thể bao gồm mức độ phân bố giống hệt nhau và/hoặc gắn kết cùng epitop, ngoại trừ cho các biến thể kháng thể có thể, ví dụ, có chứa các đột biến xảy ra tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất một chế kháng thể đơn dòng, các biến thể này nói chung thường có mặt với các lượng nhỏ. Ngược lại để điều chế kháng thể đa dòng, trong đó thường bao gồm các kháng thể khác nhau kháng trực tiếp các yếu tố quyết định khác nhau (các epitop), mỗi kháng thể đơn

dòng của việc điều chế kháng thể đơn dòng hướng tới việc kháng một yếu tố quyết định duy nhất trên một kháng nguyên. Nhờ đó, sự biến đổi “đơn dòng” cho thấy đặc tính của kháng thể như đã thu được từ một mức độ phân bố đồng nhất đáng kể của các kháng thể, và không phải là để được hiểu như yêu cầu sản xuất của kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng được sử dụng phù hợp với sáng chế có thể được thực hiện bởi một loạt các kỹ thuật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp tế bào lai, các phương pháp tái tổ hợp ADN, các phương pháp hiển thị thể thực khuẩn, và các phương pháp sử dụng các động vật chuyển gen có chứa tất cả hoặc một phần các locus globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp làm ví dụ khác để tạo thành các kháng thể đơn dòng được mô tả theo sáng chế.

“Kháng thể trần” đề cập đến kháng thể không được tiếp hợp với gốc khác loại (ví dụ, một gốc gây độc) hoặc đánh dấu phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt trong một dược phẩm.

"Các kháng thể tự nhiên" đề cập đến các phân tử globulin miễn dịch xảy ra tự nhiên có các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, các kháng thể IgG tự nhiên là các glycoprotein dị tetrame kích thước khoảng 150.000 dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ giống hệt nhau và hai chuỗi nặng giống hệt nhau được gắn kết bởi liên kết disulfit. Từ đầu N- đến C-, mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (VH), cũng được gọi là miền chuỗi nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, tiếp theo bởi ba miền ổn định (CH1, CH2, và CH3), cũng được gọi là vùng ổn định chuỗi nặng. Tương tự, từ đầu N- đến C-, mỗi chuỗi nhẹ có một vùng biến đổi (VL), cũng được gọi là miền biến đổi chuỗi nhẹ hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, tiếp theo bởi một vùng chuỗi nhẹ ổn định (CL), cũng được gọi là vùng ổn định chuỗi nhẹ. Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được chỉ định cho một trong hai typ, được gọi là kapa (κ) và lambda (λ), dựa vào trình tự axit amin của miền ổn định của nó.

“Phản ứng chéo không đáng kể” có nghĩa là một phân tử (ví dụ, kháng thể) không nhận biết hoặc gắn kết đặc hiệu kháng nguyên khác nhau từ kháng nguyên đích thực tế của phân tử (ví dụ, kháng nguyên liên quan chặt chẽ với kháng nguyên đích), cụ thể là khi so với kháng nguyên đích. Ví dụ, kháng thể có thể gắn kết ít hơn khoảng 10% đến ít hơn khoảng 5% với kháng nguyên khác với kháng nguyên đích cụ thể, hoặc có thể gắn kết với kháng nguyên khác so với kháng nguyên đích cụ thể với lượng được chọn từ nhóm bao gồm ít hơn khoảng 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, hoặc 0,1%, tốt hơn là ít hơn khoảng 2%, 1%, hoặc 0,5%, và tốt nhất là ít hơn khoảng 0,2% hoặc 0,1% kháng nguyên khác so với kháng nguyên đích cụ thể.

Thuật ngữ “gói chèn” được sử dụng để đề cập đến các hướng dẫn thông thường được bao gồm trong các gói có bán trên thị trường của các sản phẩm điều trị, có chứa thông tin về các chỉ dẫn, cách sử dụng, liều lượng, tuyến cung cấp, điều trị kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm điều trị này.

Thuật ngữ kháng thể "me" đề cập đến kháng thể được sử dụng như là điểm khởi đầu hoặc cơ sở để điều chế một biến thể.

“Phần trăm (%) độ tương đồng trình tự axit amin” liên quan đến một trình tự polypeptit tham chiếu được xác định như tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin trong một trình tự đại diện tiêu biểu giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi so sánh các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được tối đa phần trăm trình tự tương đồng với, và không xem xét bất kỳ sự thay thế bảo tồn như một phần của trình tự tương đồng này. Việc so sánh nhằm xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng về trình tự axit amin có thể thu được bằng các cách khác nhau và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính công bố công khai như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các thông số thích hợp để

so sánh trình tự, bao gồm thuật toán bất kỳ cần thiết để đạt được sự sắp xếp tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự đang được so sánh. Tuy nhiên, với mục đích ở đây, các giá trị về % mức độ tương đồng về trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp với các tài liệu của người sử dụng trong Văn phòng Bản quyền Hoa Kỳ, Washington D.C., 20559, mà được đăng ký với số đăng ký bản quyền Hoa Kỳ TXU510087. Chương trình ALIGN-2 là được tiếp cận công khai từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được biên dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm cả UNIX V4,0D kỹ thuật số. Tất cả các thông số so sánh trình tự được thiết lập bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong tình huống mà ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % trình tự axit amin tương đồng với của một trình tự axit amin nhất định A, so với, hoặc kháng trình tự axit amin nhất định B (có thể được diễn đạt như là trình tự axit amin nhất định A có hoặc bao gồm % trình tự axit amin nào đó tương đồng, so với, hoặc kháng trình tự axit amin nhất định B) được tính theo công thức sau:

$$100 \text{ lần phân số } X/Y$$

trong đó X là số các gốc axit amin đạt được cho là đồng nhất bởi chương trình so sánh trình tự ALIGN-2 trong đó sự sắp xếp của chương trình A và B, và trong đó Y là tổng số các gốc axit amin trong B. Nó sẽ được đánh giá cao rằng trong đó chiều dài của trình tự axit amin A không bằng chiều dài của trình tự axit amin B, % trình tự axit amin tương đồng của A đến B sẽ không bằng % trình tự axit amin tương đồng với B so với A. Trừ khi có quy định cụ thể khác, tất cả % trình tự axit amin tương đồng với các giá trị được sử dụng ở đây thu được như

được mô tả trong đoạn trước liền kề bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Tương tự, bởi một axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất, ví dụ, 95% "tương đồng" với một trình tự nucleotit tham khảo theo sáng chế, thì được dự kiến rằng trình tự nucleotit của polynucleotit này là tương đồng với trình tự tham khảo ngoại trừ trình tự polynucleotit có thể chứa tới năm điểm đột biến cho mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit tham chiếu. Nói cách khác, để có được một polynucleotit có mức độ tương đồng về trình tự nucleotit ít nhất 95% so với trình tự nucleotit tham khảo, lên đến 5% của các nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được loại bỏ hoặc được thế bằng nucleotit khác, hoặc số các nucleotit lên đến 5% tổng số các nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được chèn vào trong trình tự tham khảo. Các thay đổi này của trình tự tham khảo có thể xảy ra ở các vị trí đầu 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit tham khảo hoặc điểm bất kỳ giữa hai đầu đó, xen kẽ hoặc từng gốc giữa các gốc trong trình tự tham khảo hoặc trong một hoặc nhiều nhóm tiếp giáp trong trình tự tham khảo. Thực tế rằng, cho dù polynucleotit hoặc polypeptit cụ thể bất kỳ có mức độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự nucleotit hoặc trình tự polypeptit theo sáng chế thì có thể được xác định dễ dàng bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình nêu trên.

Thuật ngữ "công thức được" đề cập đến sự điều chế, trong đó ở dạng này cho phép các hoạt động sinh học của một thành phần hoạt tính chứa trong đó có hiệu quả, và trong đó không chứa các thành phần bổ sung có độc tính không thể chấp nhận với một đối tượng để trong đó sự tạo thành công thức sẽ được cung cấp.

“Chất mang được dụng” đề cập đến thành phần trong một công thức được ngoài thành phần hoạt tính, mà không gây độc cho đối tượng. Một chất mang

được dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất ổn định, hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ “protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP)” theo sáng chế, đề cập đến FAP tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả động vật có vú như các động vật linh trưởng (ví dụ, người, xem số truy cập GenBank AAC51668) và các động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột, xem số truy cập GenBank AAH19190), trừ khi có các chỉ định khác. Thuật ngữ bao gồm “toàn bộ độ dài,” FAP chưa qua xử lý cũng như dạng bất kỳ của FAP mà có các kết quả từ việc xử lý trong tế bào. Thuật ngữ cũng bao gồm các biến thể xảy ra tự nhiên của FAP, ví dụ, các biến thể mối nối hoặc các biến thể toàn bộ. Tốt hơn là, kháng thể kháng FAP theo sáng chế gắn kết với miền ngoại bào của FAP. Trình tự axit amin của các miền ngoài FAP người, chuột và khỉ khỉ cynomolgus làm ví dụ (với poly-lyzin đầu C và 6x His-tag) được nêu trong SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 319, và SEQ ID NO: 321 tương ứng.

Theo sáng chế, “điều trị” và các biến thể về ngữ pháp của chúng đề cập đến sự can thiệp lâm sàng trong một nỗ lực để thay đổi nguyên nhân bệnh tự nhiên của cá thể đang được điều trị, và có thể được thực hiện hoặc để dự phòng hoặc trong quá trình bệnh học lâm sàng. Các hiệu ứng mong muốn về điều trị bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngăn chặn sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, giảm các triệu chứng, giảm bớt bất kỳ hậu quả trực tiếp hoặc gián tiếp về bệnh lý của bệnh, ngăn ngừa di căn, giảm tỷ lệ về sự tiến triển bệnh, cải thiện hoặc làm giảm bớt tình trạng bệnh, và thuyên giảm hoặc tiêu lượng bệnh được cải thiện. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh.

Thuật ngữ “vùng biến đổi” hoặc “miền biến đổi” đề cập đến miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kháng thể có liên quan đến sự gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL tương ứng) của một kháng thể tự nhiên nói chung có các cấu trúc tương tự, với mỗi

miền bao gồm bốn vùng khung bảo tồn (FRs) và ba vùng siêu biến đổi (các HVR). (Xem, ví dụ, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman và Co., page 91 (2007)). Miền VH hoặc VL duy nhất có thể là đủ để tạo ra đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Hơn nữa, các kháng thể gắn kết một kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể gắn kết kháng nguyên để quét thư viện của các miền VL hoặc VH bổ sung tương ứng. Xem, ví dụ, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Thuật ngữ "vector" theo sáng chế, đề cập đến một phân tử axit nucleic có khả năng truyền axit nucleic khác mà nó được liên kết. Thuật ngữ bao gồm vector như một cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector được kết hợp trong bộ gen của tế bào chủ mà nó đã được đưa vào. Các vector nào đó là có khả năng chỉ đạo biểu hiện của các axit nucleic mà trong đó chúng được liên kết về mặt thực hành. Các vector này được đề cập đến ở đây là "các vector biểu hiện".

Theo sáng chế, thuật ngữ "polypeptit có hoạt tính GnTIII" đề cập đến các polypeptit có khả năng xúc tác việc bổ sung của một gốc N-axetylglucosamin (GlcNAc) trong liên kết β -1-4 đến manosit được liên kết β - của lõi trimannosyl của các oligosacarit liên kết N. Điều này bao gồm các polypeptit hợp nhất thể hiện hoạt tính enzym tương tự với, nhưng không nhất thiết phải giống với, hoạt động của β (1,4)-N-axetylglucosaminyltransferaza III, còn được gọi là β -1,4-manosyl-glycoprotein 4-beta-N-axetylglucosaminyl-transferaza (EC 2,4,1,144), theo Ủy ban Danh mục của Liên minh quốc tế về Hóa sinh và sinh học phân tử (NC-IUBMB), như được đo trong một thử nghiệm sinh học cụ thể, có hoặc không có sự phụ thuộc liều dùng. Trong trường hợp trong đó sự phụ thuộc liều tồn tại, nó không cần phải giống với GnTIII, mà gần như tương tự với sự phụ thuộc liều dùng trong một hoạt động nhất định so với GnTIII (tức là, polypeptit đại diện tiêu biểu sẽ thể hiện hoạt tính lớn hơn hoặc không hơn ít hơn khoảng 25

lần và, tốt hơn là, ít hơn không quá khoảng mười lần hoạt tính, và tốt nhất là, ít hơn không quá khoảng ba lần hoạt tính có liên quan đến GnTIII).

Theo sáng chế, thuật ngữ “miền định vị Golgi” đề cập đến trình tự axit amin của một polypeptit trong Golgi trong đó chịu trách nhiệm neo polypeptit đến một vị trí trong phức hợp Golgi. Nói chung, các miền định vị bao gồm đầu "cuối" của một enzym.

Theo sáng chế, các thuật ngữ “xử lý, được xử lý, đang xử lý,” cụ thể là với tiền tố “glyco-,” cũng như thuật ngữ “xử lý glycosyl hóa” được coi là để bao gồm bất kỳ thao tác nào của mẫu glycosyl hóa của một polypeptit hoặc đoạn của chúng xảy ra tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Xử lý glycosyl hóa bao gồm xử lý trao đổi chất của cơ cấu glycosyl hóa của một tế bào, bao gồm cả các thao tác di truyền của các tuyến tổng hợp oligosacarit để đạt được glycosyl thay đổi của các glycoprotein được biểu hiện trong các tế bào. Hơn nữa, xử lý glycosyl hóa bao gồm các tác động của các đột biến và môi trường tế bào lên glycosyl hóa. Theo một phương án, xử lý glycosyl hóa là một sự thay đổi trong hoạt động glycosyltransferaza. Theo một phương án cụ thể, các kết quả xử lý trong hoạt động glucosaminyltransferaza và/hoặc hoạt động fucosyltransferaza thay đổi.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tính gây độc tế bào qua trung gian Fc-” bao gồm tính độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC) và tính gây độc tế bào qua trung gian bởi một có thể hòa tan protein hợp nhất Fc- có chứa vùng Fc-người. Đó là một cơ chế miễn dịch dẫn đến sự suy giảm của “tế bào đích” bởi “tế bào phản ứng miễn dịch người”.

Theo sáng chế, thuật ngữ “các tế bào phản ứng miễn dịch người” đề cập đến mức độ phân bố của các bạch cầu hiển thị các thụ thể Fc trên bề mặt của chúng, thông qua đó chúng gắn kết với vùng Fc- của các kháng thể hoặc của các protein hợp nhất Fc- và thực hiện các chức năng phản ứng. Mức độ phân bố này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và/hoặc các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK).

Theo sáng chế, thuật ngữ “các tế bào đích” đề cập đến các tế bào để trong đó các phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng Fc (ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn của chúng bao gồm vùng Fc) hoặc các protein gắn kết đặc hiệu hợp nhất Fc-. Các phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc các protein hợp nhất Fc-gắn kết với các tế bào đích nhờ phần protein có đầu N- với vùng Fc.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tính gây độc tế bào qua trung gian Fc tăng” được xác định hoặc như việc tăng về số lượng “các tế bào đích” được dung giải trong một thời gian nhất định, ở một nồng độ nhất định của kháng thể hoặc của protein hợp nhất Fc trong môi trường xung quanh các tế bào đích, bằng cơ chế của tính gây độc tế bào qua trung gian Fc được xác định ở trên, và/hoặc việc giảm về nồng độ của kháng thể hoặc của protein hợp nhất Fc, trong môi trường xung quanh các tế bào đích, được yêu cầu để đạt được sự suy giảm của một số lượng nhất định “các tế bào đích,” trong một thời gian nhất định, bằng cơ chế của tính gây độc tế bào qua trung gian Fc. Sự gia tăng về tính gây độc tế bào qua trung gian Fc có liên quan đến tính gây độc tế bào qua trung gian của cùng phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc protein hợp nhất Fc được tạo ra bởi cùng loại các tế bào chủ, bằng cách sử dụng cùng phương pháp tiêu chuẩn sản xuất, sự thanh lọc, tạo công thức và lưu giữ, (mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật) nhưng chưa từng được tạo ra bởi các tế bào chủ được xử lý để có một mẫu glycosyl hóa được thay đổi (ví dụ, để biểu hiện glycosyltransferaza, GnTIII, hoặc các glycosyltransferaza khác) bằng các phương pháp được mô tả ở đây.

Bởi “kháng thể có tế bào trung gian gây độc tăng phụ thuộc kháng thể (ADCC)” có nghĩa là một kháng thể, như thuật ngữ được xác định theo sáng chế, có ADCC tăng như được xác định bởi phương pháp phù hợp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Một thử nghiệm ADCC *in vitro* được chấp nhận là như sau:

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

2) thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (các PBMC), được phân lập từ máu của một người hiến tặng khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên, như là tế bào phản ứng;

3) thử nghiệm được tiến hành theo giao thức sau:

i) các PBMC được phân lập bằng cách sử dụng các quy trình ly tâm mật độ tiêu chuẩn và được tạo huyền phù ở 5×10^6 tế bào/ml trong môi trường nuôi tế bào RPMI;

ii) các tế bào đích được phát triển bằng các phương pháp nuôi cấy mô tiêu chuẩn, được thu hoạch từ giai đoạn tăng trưởng theo cấp số nhân với khả năng tồn tại trên 90%, được rửa trong môi trường nuôi tế bào RPMI, được gắn nhãn với 100 micro-Curies của ^{51}Cr , được rửa hai lần với môi trường nuôi tế bào, và được tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi tế bào ở mật độ là 10^5 tế bào/ml;

iii) 100 microlit của huyền phù tế bào đích cuối cùng nêu trên được cấy vào mỗi giếng của một tấm vi chuẩn 96 giếng;

iv) kháng thể được pha loãng từng kỳ từ 4000 ng/ml đến 0,04 ng/ml trong môi trường nuôi tế bào và 50 microlit của các dung dịch kháng thể tạo thành được bổ sung vào các tế bào đích trong tấm vi chuẩn 96 giếng, kiểm tra về các nồng độ kháng thể khác nhau ba lần phủ lên toàn bộ phạm vi nồng độ nêu trên;

v) đối với các kiểm soát giải phóng tối đa (MR), 3 giếng bổ sung trong tấm có chứa các tế bào đích được gắn nhãn, tiếp nhận 50 microlit của 2% (V/V) dung dịch nước của chất tẩy rửa không ion (Nonidet, Sigma, St. Louis), thay vì dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vi) đối với các kiểm soát giải phóng tự phát (SR), 3 giếng bổ sung trong tấm có chứa các tế bào đích được gắn nhãn, tiếp nhận 50 microlit của môi trường nuôi tế bào RPMI thay vì dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vii) tấm vi chuẩn 96 giếng sau đó được ly tâm ở 50 x g trong 1 phút và được nuôi cấy trong 1 giờ ở 4°C;

viii) 50 microlit của huyền phù PBMC (điểm i nêu trên) được bổ sung vào mỗi giếng để mang lại một phản ứng: tỷ lệ tế bào đích 25:1 và các tấm được đặt trong một lồng ấp trong điều kiện khí CO₂ 5% ở 37°C trong 4 giờ;

ix) tế bào nổi tự do từ mỗi giếng được thu hoạch và sự kích hoạt phóng xạ giải phóng thử nghiệm (ER) được định lượng bằng cách sử dụng truy cập gama;

x) tỷ lệ phần trăm của sự suy giảm cụ thể được tính cho mỗi nồng độ kháng thể theo công thức $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, trong đó ER là sự định lượng phóng xạ trung bình (xem điểm ix nêu trên) cho nồng độ kháng thể đó, MR là sự định lượng phóng xạ trung bình (xem điểm ix nêu trên) cho các kiểm soát MR (xem điểm v nêu trên), và SR là định lượng phóng xạ trung bình (xem điểm ix nêu trên) cho các kiểm soát SR (xem điểm vi nêu trên);

4) “ADCC tăng” được xác định hoặc như là việc tăng về tỷ lệ phần trăm tối đa của sự suy giảm cụ thể được quan sát trong phạm vi nồng độ kháng thể được thử nghiệm ở trên, và/hoặc giảm về nồng độ của kháng thể cần thiết để đạt được một nửa của tỷ lệ phần trăm tối đa của sự suy giảm cụ thể được quan sát trong phạm vi nồng độ kháng thể được thử nghiệm nêu trên. Sự gia tăng trong ADCC có liên quan đến ADCC, được đo bằng thử nghiệm trên, qua trung gian của cùng kháng thể, được tạo ra bằng cùng loại tế bào chủ, bằng cách sử dụng cùng các phương pháp sản xuất, thanh lọc, tạo công thức và lưu giữ tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng chưa từng được tạo ra bằng các tế bào chủ được xử lý để biểu hiện quá mức GnTIII.

II. Chế phẩm và phương pháp

Protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP) được biểu hiện trong phần lớn các khối u, nhưng về cơ bản không có mặt trong các mô người trưởng thành khỏe mạnh, do đó các kháng thể hướng đích đến kháng nguyên này có tiềm năng về mặt điều trị rất tốt. Sáng chế cung cấp các kháng thể gắn kết với FAP, cụ thể là

các kháng thể có ái lực cao và các chức năng phản ứng mạnh. Kháng thể theo sáng chế là hữu ích để, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị các bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP, như bệnh ung thư.

A. Kháng thể kháng FAP làm ví dụ

Sáng chế cung cấp các kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP). Cụ thể là, sáng chế cung cấp các kháng thể gắn kết đặc hiệu FAP, trong đó các kháng thể này được xử lý bằng glycogen để có chức năng phản ứng tăng.

Theo một phương án, kháng thể kháng FAP theo sáng chế bao gồm ít nhất một (ví dụ, một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu) vùng xác định bổ trợ chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153,

SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, và SEQ ID NO: 177, hoặc một biến thể hoặc dạng rút gọn của chúng có chứa ít nhất các gốc xác định đặc hiệu (các SDR) cho CDR này.

Theo một phương án, ít nhất một CDR này là một chuỗi nặng CDR, cụ thể là chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, và SEQ ID NO: 141. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm ít nhất một chuỗi nặng CDR và ít nhất một chuỗi nhẹ CDR, cụ thể là chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, và SEQ ID NO: 141, và chuỗi nhẹ CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175 và SEQ ID NO: 177.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc toàn bộ ba trình tự chuỗi nặng CDR (HCDR) được chọn từ (a) HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, và SEQ ID NO: 33; (b) HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID

NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, và SEQ ID NO: 133; và (c) HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, và SEQ ID NO: 141. Theo một phương án nữa, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm (a) chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, và SEQ ID NO: 33; (b) chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, và SEQ ID NO: 133; và (c) chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, và SEQ ID NO: 141, hoặc các biến thể hoặc các dạng rút gọn của chúng có chứa ít nhất các SDR cho các CDR này.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự chuỗi nhẹ CDR (LCDR) được chọn từ (a) LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, và SEQ ID NO: 149; (b) LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, và SEQ ID NO: 161; và (c) LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, và SEQ ID NO: 177. Theo một phương án nữa, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm (a) chuỗi nhẹ CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, và SEQ ID NO: 149; (b) chuỗi nhẹ CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, và SEQ ID NO: 161; và (c) chuỗi nhẹ CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, và SEQ ID NO: 177, hoặc các biến thể hoặc các dạng rút gọn của chúng có chứa ít nhất các SDR cho các CDR này.

Theo một phương án cụ thể hơn, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, và SEQ ID NO: 33; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63,

SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, và SEQ ID NO: 133; và chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, và SEQ ID NO: 141, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, và SEQ ID NO: 149; chuỗi nhẹ CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, và SEQ ID NO: 161; và chuỗi nhẹ CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, và SEQ ID NO: 177, hoặc các biến thể hoặc các dạng rút gọn của chúng có chứa ít nhất các SDR cho các CDR này.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, và SEQ ID NO: 33; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65,

SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, và SEQ ID NO: 133; và chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, và SEQ ID NO: 141, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, và SEQ ID NO: 149; chuỗi nhẹ CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, và SEQ ID NO: 161; và chuỗi nhẹ CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, và SEQ ID NO: 177, trong đó ít nhất một trong số các CDR này được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID

NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 và SEQ ID NO: 177.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, và SEQ ID NO: 33; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, và SEQ ID NO: 133; và chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, và SEQ ID NO: 141, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, và SEQ ID NO: 149; chuỗi nhẹ CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, và SEQ ID NO: 161; và chuỗi nhẹ CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175,

và SEQ ID NO: 177, trong đó ít nhất một trong số CDR này không phải là CDR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO: 175.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, và SEQ ID NO: 27; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, và SEQ ID NO: 107; và chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, và SEQ ID NO: 141, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, và SEQ ID NO: 149; chuỗi nhẹ CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, và SEQ ID NO: 161; và chuỗi nhẹ CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, và SEQ ID NO: 175, hoặc các biến thể hoặc các dạng rút gọn của chúng có chứa ít nhất các SDR cho các CDR này.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 69, và SEQ ID NO: 101; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 135, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 143, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 151, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 163. Theo một phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 71, và SEQ ID NO: 103; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 137, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 145, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 153, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 165. Theo một phương án cụ thể khác nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 69, và SEQ ID NO: 101; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 137, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 147, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 155, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 167. Theo một phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 73, và SEQ ID NO: 105; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 135, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 145, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 153, và chuỗi

nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 169. Theo một phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 69, và SEQ ID NO: 101; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 137, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 149, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 157, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 167. Theo một phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23, và SEQ ID NO: 29; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, và SEQ ID NO: 131; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 135, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 143, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 151, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 163. Theo một phương án cụ thể nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 31, và SEQ ID NO: 33; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 127, và SEQ ID NO: 133; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 137, và vùng biến đổi chuỗi

nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 147, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 155, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 167. Theo một phương án cụ thể nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 69, và SEQ ID NO: 101; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 135, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 143, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 151, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 177. Theo một phương án cụ thể nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 77, và SEQ ID NO: 109; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 135, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 143, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 151, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 163. Theo một phương án cụ thể nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 79, và SEQ ID NO: 111; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 135, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 143, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 151, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 163. Theo một phương án cụ thể nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 89, và SEQ ID NO: 131; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong

SEQ ID NO: 135, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 143, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 151, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 163. Theo một phương án cụ thể nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 23; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 81, và SEQ ID NO: 113; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 135, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 143, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 151, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 163. Theo một phương án cụ thể nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 19, và SEQ ID NO: 31; chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 95, và SEQ ID NO: 127; và chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 137, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 147, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 155, và chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 167.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311. Theo một

phương án, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307 và SEQ ID NO: 311.

Theo các phương án bất kỳ, trình tự VH có mức độ tương đồng ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự chứa những sự thay thế (ví dụ, những sự thay thế bảo tồn), chèn vào, hoặc loại bỏ có liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng một kháng thể kháng FAP bao gồm trình tự đó vẫn có khả năng gắn kết với FAP. Theo các phương án bất kỳ, tổng số 1 đến 10 axit amin đã từng được thế, được chèn vào và/hoặc loại bỏ trong SEQ ID NO 197, 201, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243, 247, 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307 hoặc 311. Theo các phương án bất kỳ, những sự thay thế, chèn vào, hoặc loại bỏ xảy ra ở các vùng bên ngoài các HVR hoặc các CDR (tức là, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng FAP theo sáng chế bao gồm các trình tự VH nêu trong SEQ ID NO: 197, 201, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243, 247, 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307 hoặc 311, bao gồm cả những sự thay đổi sau tịnh tiến của trình tự đó. Theo một phương án cụ thể, VH bao gồm một, hai hoặc ba chuỗi nặng CDR được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139 và 141 cho HCDR1, HCDR2 và HCDR3.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305 và SEQ ID NO: 309. Theo phương án khác nữa, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305 và SEQ ID NO: 309.

Theo các phương án bất kỳ, trình tự VL có mức độ tương đồng ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự chứa những sự thay thế (ví dụ, những sự thay thế bảo tồn), chèn vào, hoặc loại bỏ có liên quan đến trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng FAP bao gồm trình tự đó vẫn có khả năng gắn kết với FAP. Theo các phương án bất kỳ, tổng số của 1 đến 10 axit amin đã từng được thế, được chèn vào và/hoặc loại bỏ trong SEQ ID NO 193, 195, 199, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229, 233, 237, 241, 245, 249, 253, 257, 261, 265, 269, 273, 277, 281, 285, 289, 293, 297, 301, 305 hoặc 309. Theo các phương án bất kỳ, những sự thay thế, chèn vào, hoặc loại bỏ xảy ra ở

các vùng bên ngoài các HVR hoặc các CDR (tức là, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng FAP theo sáng chế bao gồm trình tự VL nêu trong SEQ ID NO: 193, 195, 199, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229, 233, 237, 241, 245, 249, 253, 257, 261, 265, 269, 273, 277, 281, 285, 289, 293, 297, 301, 305 hoặc 309, bao gồm cả những sự thay đổi sau tịnh tiến của trình tự đó. Theo một phương án cụ thể, VL bao gồm một, hai hoặc ba chuỗi nhẹ CDR được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 và 177 đối với LCDR1, LCDR2 và LCDR3.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng FAP được cung cấp, trong đó kháng thể bao gồm VH như trong các phương án bất kỳ nêu trên, và VL như trong các phương án bất kỳ nêu trên. Theo một phương án, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO:

281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309. Theo một phương án, kháng thể bao gồm các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO 197, 201, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243, 247, 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307 or 311, và SEQ ID NO 193, 195, 199, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229, 233, 237, 241, 245, 249, 253, 257, 261, 265, 269, 273, 277, 281, 285, 289, 293, 297, 301, 305 hoặc 309 tương ứng, bao gồm cả những sự thay đổi sau tịnh tiến của các trình tự này.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309, trong đó ít nhất một trong số các vùng biến đổi này không bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO:

209, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 253, và SEQ ID NO: 255.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309, trong đó ít nhất một trong số các vùng biến đổi này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, và SEQ ID NO: 255, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249 và SEQ ID NO: 253.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:197, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 193 hoặc SEQ ID NO: 195. Theo một phương án cụ thể khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 201 hoặc SEQ ID NO: 203, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 199. Theo một phương án cụ thể khác nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 205. Theo một phương án cụ thể khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 211, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 209. Theo một phương án cụ thể khác nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 219, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình

tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 217. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 293. Theo một phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế bao gồm a) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 303, và SEQ ID NO: 307, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 195, hoặc b) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin or SEQ ID NO: 299 hoặc SEQ ID NO: 311, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 205, hoặc c) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin hoặc SEQ ID NO: 197, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 293. Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 259 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 195. Theo một phương án cụ thể khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 263 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 195. Theo một phương án cụ thể khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 307 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 305. Theo một phương án cụ thể khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 267 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 265. Theo một phương án cụ thể

khác nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 299, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 205. Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo các phương án bổ sung bất kỳ nêu trên bao gồm vùng Fc hoặc vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng Fc, cụ thể là vùng Fc IgG, đặc biệt nhất là vùng Fc IgG1.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế là toàn bộ độ dài kháng thể, cụ thể là kháng thể lớp IgG, đặc biệt nhất là kháng thể isotyp IgG1. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế là đoạn kháng thể, được chọn từ nhóm bao gồm: đoạn scFv, đoạn Fv, đoạn Fab, và đoạn F(ab')₂. Theo một phương án nữa, kháng thể theo sáng chế là đoạn kháng thể có vùng Fc, hoặc protein hợp nhất bao gồm vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là dạng khảm, đặc biệt hơn là được làm tương thích với người. Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế là của người. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng ổn định người. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng Fc người, cụ thể là vùng Fc IgG người, cụ thể hơn nữa là vùng Fc IgG1 người.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng, trong đó vùng ổn định chuỗi nặng này là vùng ổn định IgG người, cụ thể là vùng ổn định IgG1 người, bao gồm vùng Fc. Theo một phương án cụ thể, kháng thể bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 313. Theo một phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng ổn định chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 315. Theo một phương án cụ thể khác nữa, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

313, và vùng ổn định chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 315.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế cung cấp kháng thể gắn kết đặc hiệu với FAP, trong đó kháng thể này bao gồm a) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309, hoặc sự kết hợp của chúng, và b) vùng Fc hoặc vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng Fc, trong đó vùng Fc này là vùng Fc được xử lý bằng glycogen. Theo một phương án nữa, kháng thể theo sáng chế được xử lý bằng glycogen để có các oligosacarit biến

đôi trong vùng Fc. Theo một phương án cụ thể, kháng thể có tỷ lệ các oligosacarit được cắt đôi tăng trong vùng Fc, so với kháng thể không được xử lý bằng glycogen. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất khoảng 10%, khoảng 15%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, hoặc khoảng 100%, tốt hơn là ít nhất khoảng 50%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 70%, của các oligosacarit liên kết N trong vùng Fc của kháng thể được cắt đôi. Các oligosacarit được cắt đôi có thể là của typ lai hoặc phức hợp.

Theo một phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế có tỷ lệ các oligosacarit không được fucosylat hóa tăng trong vùng Fc, so với kháng thể không được xử lý bằng glycogen. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, hoặc khoảng 100%, tốt hơn là ít nhất khoảng 50%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 70%, của các oligosacarit liên kết N trong vùng Fc của kháng thể không được fucosylat hóa. Các oligosacarit không được fucosylat hóa có thể là của typ lai hoặc phức hợp.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế có tỷ lệ các oligosacarit không được fucosylat hóa, được cắt đôi tăng trong vùng Fc, so với kháng thể không được xử lý bằng glycogen. Cụ thể là, kháng thể bao gồm vùng Fc trong đó ít nhất khoảng 10%, khoảng 15%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, hoặc khoảng 100%, tốt hơn là ít nhất khoảng 15%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 35% hoặc ít nhất khoảng 50% của các oligosacarit liên kết N được cắt đôi, không được fucosylat

hóa. Các oligosacarit không được fucosylat hóa được cắt đôi, có thể là của typ lai hoặc phức hợp.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có chức năng phản ứng tăng và/hoặc ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng. Chức năng phản ứng tăng và/hoặc gắn kết thụ thể Fc tăng có thể dẫn đến ví dụ, từ xử lý bằng glycogen và/hoặc ái lực trưởng thành của các kháng thể. Theo một phương án, chức năng phản ứng tăng và/hoặc gắn kết thụ thể Fc tăng là kết quả của xử lý bằng glycogen của vùng Fc của kháng thể. Theo một phương án khác, chức năng phản ứng tăng và/hoặc gắn kết thụ thể Fc tăng là kết quả của sự kết hợp của ái lực và xử lý bằng glycogen tăng. Chức năng phản ứng tăng có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều vấn đề sau: tính gây độc tế bào qua trung gian Fc tăng (bao gồm cả tính độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC)) tăng, thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) tăng, tiết xytokin tăng, sự hấp thu qua trung gian phức hợp miễn dịch kháng nguyên tăng bởi các tế bào có mặt kháng nguyên, gắn kết tăng với các tế bào NK, gắn kết tăng với các đại thực bào, gắn kết tăng với các bạch cầu đơn nhân, gắn kết tăng với các tế bào đa nhân, gây chết tế bào gây ra tín hiệu trực tiếp tăng, liên kết ngang tăng của các kháng thể gắn kết đích, sự trưởng thành tế bào đuôi gai tăng, hoặc môi trường tế bào T tăng. Theo một phương án cụ thể, chức năng phản ứng tăng là ADCC tăng. Tốt hơn là, gắn kết thụ thể Fc tăng là gắn kết tăng với thụ thể Fc kích hoạt, tốt nhất là FcγRIIIa.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế không gây ra mức độ đáng kể về mặt lâm sàng về tính độc khi được cung cấp cho một cá thể trong một lượng điều trị hữu hiệu.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là ái lực hoàn thiện. Theo một phương án nữa, kháng thể theo sáng chế gắn kết với nguyên bào sợi kích hoạt Protein giá trị có hằng số phân ly (K_D) thấp hơn khoảng 1 μ M đến khoảng 0,001 nM, cụ thể là giá trị K_D thấp hơn khoảng 100 nM, thấp hơn khoảng 10 nM, thấp hơn khoảng 1 nM, hoặc thấp hơn khoảng 0,1 nM. Theo một phương

án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với FAP người, chuột và khỉ cynomolgus. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với FAP người và khỉ cynomolgus. Theo một phương án cụ thể hơn, kháng thể theo sáng chế gắn kết với FAP người, chuột và khỉ cynomolgus có giá trị K_D thấp hơn khoảng 200 nM, thấp hơn khoảng 100 nM, đặc biệt hơn là thấp hơn khoảng 10 nM hoặc thấp hơn khoảng 1 nM, đặc biệt nhất là thấp hơn 0,1 nM. Các giá trị K_D được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, bằng cách sử dụng các kháng thể như Fab hoặc IgG, cụ thể là IgG.

Theo một phương án, kháng thể kháng FAP theo sáng chế gắn kết FAP trong các mô người. Theo một phương án, kháng thể kháng FAP theo sáng chế là phản ứng ngang cho FAP người và chuột. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế không có phản ứng chéo đáng kể với các thành viên khác của họ dipeptidyl peptidaza IV, cụ thể là với DPPIV/CD26. Theo một phương án, kháng thể kháng FAP theo sáng chế không gây ra sự đồng hóa của FAP nhờ sự gắn kết của kháng thể này với FAP được biểu hiện trên bề mặt của một tế bào.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế cung cấp kháng thể gắn kết đặc hiệu với FAP, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ

ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309, và vùng Fc IgG người, và trong đó, tùy ý kháng thể này được xử lý bằng glycogen để có chức năng phản ứng và/hoặc ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế cung cấp kháng thể gắn kết đặc hiệu với FAP, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309, và vùng Fc IgG người, và trong đó kháng thể này có tỷ lệ các oligosacarit không được fucosylat hóa tăng và/hoặc tỷ lệ các oligosacarit được cắt đôi tăng trong vùng Fc này.

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp đề kháng thể gắn kết đặc hiệu với FAP, trong đó kháng thể này có nguồn gốc từ một kháng thể mẹ bao gồm chuỗi nặng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, chuỗi nặng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 35, chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139 và SEQ ID NO: 141, chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 145, chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 153 và chuỗi nhẹ CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO: 175, và trong đó kháng thể này bao gồm ít nhất một sự thay thế hoặc loại bỏ axit amin trong ít nhất một chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng CDR của kháng thể mẹ. Ví dụ, kháng thể có thể bao gồm ít nhất một, ví dụ, từ khoảng một đến khoảng mười (tức là, khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10), và cụ thể là từ khoảng hai đến khoảng năm, những sự thay thế trong một hoặc nhiều vùng siêu biến đổi hoặc các CDR (tức là, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 vùng siêu biến đổi hoặc các CDR) của kháng thể mẹ. Theo các phương án bất kỳ, bất kỳ một hoặc nhiều axit amin của kháng thể mẹ như được cung cấp ở trên được thế hoặc loại bỏ ở các vị trí CDR sau:

- Chuỗi nặng CDR1 (SEQ ID NO: 3): các vị trí 2 và 3
- Chuỗi nặng CDR2 (SEQ ID NO: 35): các vị trí 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 và 9
- Chuỗi nhẹ CDR1 (SEQ ID NO: 145): các vị trí 7, 8 và 9
- Chuỗi nhẹ CDR2 (SEQ ID NO: 153): các vị trí 1, 2, 3, 4 và 5
- Chuỗi nhẹ CDR3 (SEQ ID NO 165, 167, 169, 171, 173 hoặc 175): các vị trí 4, 5, 6 và 7

Theo các phương án bất kỳ, những sự thay thế là những sự thay thế bảo tồn, như được cung cấp ở đây. Theo các phương án bất kỳ, bất kỳ một hoặc nhiều những sự thay thế hoặc loại bỏ dưới đây có thể được thực hiện bằng sự kết hợp bất kỳ:

- Chuỗi nặng CDR1 (SEQ ID NO: 3): Y2F, H hoặc S, A3T
- Chuỗi nặng CDR2 (SEQ ID NO: 35): A1G, S3G, I, W or L, G4V, S, A hoặc T, S5G hoặc N, G6T hoặc, G7R, S, A, E hoặc N, S8Y, L, R, I, N, Q, I hoặc loại bỏ, T9 loại bỏ
- Chuỗi nhẹ CDR1 (SEQ ID NO: 145): S7T, S8R hoặc S9N
- Chuỗi nhẹ CDR2 (SEQ ID NO: 153): Y1N, I hoặc Q, G2V, A3G, S4T hoặc Y, S5R, T hoặc I
- Chuỗi nhẹ CDR3 (SEQ ID NO 165, 167, 169, 171, 173, hoặc 175): G4A, Q, N, L hoặc H5I, L, V, Q, N hoặc I6M, I7L

Ngoài ra, các kháng thể cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều sự bổ sung, loại bỏ và/hoặc những sự thay thế trong một hoặc nhiều vùng khung của hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, so với kháng thể mẹ. Theo một phương án, ít nhất một thay thế axit amin này trong ít nhất một CDR góp phần để ái lực gắn kết của kháng thể tăng so với kháng thể mẹ của nó. Theo một phương án khác kháng thể này có ái lực cho FAP lớn hơn ít nhất khoảng 2 lần đến khoảng 10 lần so với kháng thể mẹ (khi so sánh kháng thể theo sáng chế và kháng thể mẹ trong cùng định dạng, ví dụ, dạng Fab). Hơn nữa, kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể mẹ có thể kết hợp các đặc tính bất kỳ, đơn lẻ hoặc kết hợp, được mô tả trong các đoạn trước trong mối quan hệ với các kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế cũng cung cấp các polynucleotit mã hóa các kháng thể gắn kết đặc hiệu với FAP. Theo một khía cạnh, sáng chế hướng tới polynucleotit phân lập mã hóa polypeptit tạo thành một phần kháng thể kháng FAP theo sáng chế như đã mô tả. Theo một phương án, polynucleotit phân lập mã hóa chuỗi nặng kháng thể và/hoặc chuỗi nhẹ kháng thể tạo thành một phần kháng thể kháng FAP theo sáng chế như đã mô tả.

Theo một phương án, sáng chế hướng tới một polynucleotit phân lập bao gồm trình tự mã hóa một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu)

vùng xác định bổ trợ chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (các CDR) nêu trong SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 và 177, hoặc biến thể hoặc dạng rút gọn của chúng có chứa ít nhất các các gốc xác định đặc hiệu (các SDR) cho CDR này. Theo một phương án khác, polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa ba chuỗi nặng CDR (ví dụ, HCDR1, HCDR2, và HCDR3) hoặc ba chuỗi nhẹ CDR (ví dụ, LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chọn từ SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 và 177, hoặc các biến thể hoặc các dạng rút gọn của chúng có chứa ít nhất các SDR cho mỗi trong số ba vùng xác định bổ trợ này. Theo phương án khác nữa, polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa ba chuỗi nặng CDR (ví dụ, HCDR1, HCDR2, và HCDR3) và ba chuỗi nhẹ CDR (ví dụ, LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chọn từ SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 và 177. Theo một phương án cụ thể polynucleotit mã hóa một hoặc nhiều các CDR bao gồm trình tự có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với một hoặc nhiều các trình tự nucleotit CDR được nêu trong SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92,

94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191 và 192.

Theo một phương án nữa, polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, và/hoặc trình tự mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309. Theo một phương án cụ thể, polynucleotit mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự vùng nucleotit biến đổi của các trình tự nêu trong SEQ ID NO 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310 và 312, hoặc sự kết hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể, polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, và trình tự mã hóa vùng ổn định chuỗi nặng, cụ thể là vùng ổn định chuỗi nặng người. Theo một phương án cụ thể, vùng ổn định chuỗi nặng này là vùng ổn định IgG chuỗi nặng người, cụ thể là vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 người, bao gồm vùng Fc. Theo một phương án cụ thể, vùng ổn định chuỗi nặng này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 313. Theo một phương án cụ thể khác, polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309, và trình tự mã hóa vùng ổn định chuỗi nhẹ, cụ thể là vùng ổn định chuỗi nhẹ người. Theo một phương án cụ thể, vùng ổn định chuỗi nhẹ này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 315.

Theo một phương án, sáng chế hướng tới chế phẩm bao gồm polynucleotit phân lập thứ nhất mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ

ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, và SEQ ID NO: 311, và polynucleotit phân lập thứ hai mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, và SEQ ID NO: 309.

Theo một phương án, sáng chế hướng tới chế phẩm bao gồm polynucleotit phân lập thứ nhất bao gồm trình tự có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 268, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 308, và SEQ ID NO: 312, và polynucleotit phân lập thứ hai bao gồm trình tự có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%,

hoặc 100% so với trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 274, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 302, SEQ ID NO: 306, và SEQ ID NO: 310.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế cũng hướng đến các polypeptit phân lập được mã hóa bằng các polynucleotit bất kỳ theo sáng chế như được mô tả sau đây.

Theo một khía cạnh nữa, kháng thể kháng FAP theo các phương án bất kỳ nêu trên có thể kết hợp các đặc tính bất kỳ, đơn lẻ hoặc kết hợp, như được mô tả trong các phần 1 đến 6 dưới đây:

1. Ái lực kháng thể

Theo các phương án bất kỳ, kháng thể được cung cấp ở đây có hằng số phân ly (K_D) là $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001\text{ nM}$ (ví dụ, 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Tốt hơn là, các kháng thể được cung cấp ở đây gắn kết với nguyên bào sợi kích hoạt Protein (FAP), cụ thể là FAP người, với giá trị K_D thấp hơn 1 nM , như được xác định bởi cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

Theo một phương án, K_D được đo bằng cách sử dụng cộng hưởng Plasmon bề mặt. Thử nghiệm này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng máy BIACORE[®]-T100 (GE Healthcare) ở 25°C với các mạch CM5 để cố định kháng nguyên. Trong một thời gian ngắn, các mạch cảm biến sinh học dextran được carboxymethylat (CM5, GE Healthcare.) được kích hoạt với *N*-etyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)-cacbodiimit hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysuxinimit (NHS) theo các hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng thể kháng His (Penta

His, Qiagen) được pha loãng với 10 mM natri axetat, pH 5, đến 40 $\mu\text{g/ml}$ trước khi tiêm ở tốc độ dòng chảy 10 $\mu\text{l/phút}$ để đạt được xấp xỉ 9000 đơn vị phản ứng (RU) của protein ghép cặp. Tiếp theo việc tiêm của kháng thể kháng His, 1 M etanolamin được tiêm để chặn các nhóm không phản ứng. Sau đó, kháng nguyên đích His được tiêm ở 10 $\mu\text{l/phút}$ ở 10 nM trong 20 giây (để đo với các đoạn Fab) hoặc ở 20 nM trong 25 giây (để đo với các kháng thể IgG) và được giữ nhờ nhả His của nó bằng kháng thể kháng His được giữ cố định. Protein và các trình tự ADN của các cấu trúc kháng nguyên FAP phù hợp được nêu trong SEQ ID NO: 317-322. Để đo động lực học, sự pha loãng theo chuỗi của kháng thể (pha loãng hai lần, phạm vi giữa 6,25 nM đến 200 nM cho các đoạn Fab, hoặc pha loãng năm lần, phạm vi giữa 3,2 pM đến 10 nM cho IgG) được tiêm trong 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất có hoạt tính bề mặt P20, pH 7,4 ở 25°C ở tốc độ dòng chảy 90 $\mu\text{l/phút}$. Các thông số sau được áp dụng: Thời gian kết hợp 180 giây, phân ly 300 giây (cho Fab) hoặc 900 giây (cho IgG), phục hồi với 10 mM glyxin pH 2 trong 60 giây ở giữa mỗi chu kỳ. Các tốc độ liên kết (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một-đến-một đơn giản (Phần mềm đánh giá BIACORE[®] T100) bằng cách điều chỉnh cho phù hợp đồng thời các sensorgram liên kết và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính như tỷ lệ $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Xem, ví dụ, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999).

2. Các đoạn kháng thể

Theo các phương án bất kỳ, kháng thể được cung cấp ở đây là một đoạn kháng thể. Các đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đoạn Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, và scFv, và các đoạn khác được mô tả dưới đây. Để cân nhắc về các đoạn kháng thể nào đó, xem Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003), hoặc Carter, Nat. Rev. Immunol. 6:343-357 (2006).

Các đoạn Fv hoặc scFv chuỗi đơn bao gồm miền VH và miền VL như một chuỗi polypeptit duy nhất. Điển hình là, các miền VH và VL được nối bằng một

trình tự liên kết. Để cân nhắc về các đoạn scFv, xem, ví dụ, Plückthun, trong *Pharmacology of Monoclonals*, vol. 113, Rosenberg và Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); xem thêm WO 93/16185; và US 5,571,894 và US 5,587,458. Để thảo luận về các đoạn Fab và F(ab')₂ bao gồm các gốc epitop gắn kết thụ thể thu hồi và chu kỳ bán hủy *in vivo* tăng, xem US 5,869,046.

Các mảnh kháng thể diame là các đoạn kháng thể với các vị trí gắn kết hai kháng nguyên có thể là có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); và Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). Các mảnh kháng thể triame và các mảnh kháng thể tetrame cũng được mô tả trong Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Một mảnh kháng thể minime là dẫn xuất scFv homodime, có hóa trị hai chứa một vùng ổn định, điển hình là vùng CH3 của một globulin miễn dịch, tốt hơn là IgG, tốt hơn nữa là IgG1, như là vùng nhị trùng hóa. Nói chung, vùng ổn định được nối với scFv nhờ một vùng nối và/hoặc vùng liên kết. Các ví dụ về các protein mảnh kháng thể minime có thể được tìm thấy trong Hu et al., *Cancers Res.* 56: 3055-61 (1996).

Các miền kháng thể duy nhất là các đoạn kháng thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc toàn bộ hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án bất kỳ, miền kháng thể duy nhất là miền kháng thể duy nhất người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, ví dụ, US 6,248,516 B1).

Các đoạn kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở khả năng tiêu hóa protein thủy phân của một kháng thể còn nguyên vẹn cũng như sản xuất bởi các tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ, *E. coli* hoặc thể thực khuẩn), như được mô tả ở đây.

3. Các kháng thể dạng khảm và được làm tương thích với người

Theo các phương án bất kỳ, kháng thể được cung cấp ở đây là kháng thể dạng khảm. Các kháng thể dạng khảm bất kỳ được mô tả, ví dụ, trong US 4,816,567; và Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Trong một ví dụ, kháng thể dạng khảm bao gồm vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi có nguồn gốc từ chuột nhắt, chuột, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải của người, như khỉ) và vùng ổn định người. Trong một ví dụ khác, kháng thể dạng khảm là kháng thể “được chuyển lớp” trong đó lớp hoặc lớp phụ đã được thay đổi từ của kháng thể mẹ. Các kháng thể dạng khảm bao gồm các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo các phương án bất kỳ, một kháng thể dạng khảm được làm tương thích với kháng thể người. Điển hình là, một kháng thể không phải của người được làm tương thích với người để giảm khả năng miễn dịch gen với người, trong duy trì tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể mẹ không phải của người. Nói chung, kháng thể được làm tương thích với người bao gồm một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó các HVR, ví dụ, các CDR, (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người, và các FRs (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ các trình tự kháng thể người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần của một vùng ổn định người. Theo một số phương án, một vài các gốc FR trong kháng thể được làm tương thích với người được thế bằng các gốc tương ứng từ một kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể từ các gốc đó có nguồn gốc HVR), ví dụ, để phục hồi hoặc cải thiện đặc hiệu hoặc ái lực kháng thể. Sự tương thích với người có thể đạt được bằng các phương pháp khác nhau bao gồm cả, nhưng không chỉ giới hạn ở (a) ghép toàn bộ các miền biến đổi không phải của người trên các vùng ổn định người để tạo ra các kháng thể dạng khảm, (b) chỉ ghép các CDR không phải của người (ví dụ, kháng thể người hiến tặng) trên khung và các vùng ổn định người (ví dụ, kháng thể tiếp nhận) có hoặc không giữ lại các gốc khung then chốt (ví dụ, các gốc quan trọng để giữ lại ái lực gắn kết kháng nguyên

hoặc các chức năng kháng thể tốt), (c) chỉ ghép các vùng xác định đặc hiệu không phải của người (các SDR hoặc các CDR; các gốc then chốt cho sự tương tác kháng thể-kháng nguyên) trên các vùng ổn định và khung người, hoặc (d) cấy ghép toàn bộ các miền biến đổi không phải của người, nhưng "bảo toàn" chúng với phần cốt lõi của người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Các kháng thể được làm tương thích với người và các phương pháp tạo thành chúng được xem xét, ví dụ, trong Almagro và Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), và còn được mô tả, ví dụ, trong Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); US 5,821,337, US 7,527,791, US 6,982,321, và US 7,087,409; Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984); Morrison và Oi, *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 31(3):169-217 (1994); Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (mô tả SDR (a-CDR) ghép); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (mô tả "resurfacing"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (mô tả "FR shuffling"); và Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) và Klimka et al., *Br. J. Cancers* 83:252-260 (2000) (mô tả "chọn lựa được hướng dẫn" tiếp cận với việc thay đổi FR).

Vùng khung người mà có thể được sử dụng để tương thích với người bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: vùng khung được chọn bằng cách sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (xem, ví dụ, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); vùng khung có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của các kháng thể người của một nhóm phụ cụ thể của vùng biến đổi các chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ (xem, ví dụ, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); và Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); (xôma đã trưởng thành) vùng khung hoặc vùng khung dòng mầm người ở người trưởng thành (xem, ví dụ, Almagro và Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); và vùng khung có nguồn gốc từ việc quét các thư viện FR (xem, ví dụ, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) và Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Kháng thể người

Theo các phương án bất kỳ, kháng thể được cung cấp ở đây là kháng thể người. Các kháng thể người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kháng thể người are được mô tả nói chung trong van Dijk và van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) và Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Các kháng thể người có thể được điều chế bằng việc cung cấp gen miễn dịch cho động vật chuyển gen mà đã được biến đổi để tạo ra các kháng thể người còn nguyên vẹn hoặc các kháng thể còn nguyên vẹn với các vùng biến đổi người đáp ứng với sự kích thích kháng nguyên. Các động vật này điển hình là chứa tất cả hoặc một phần của các locus globulin miễn dịch người, trong đó thay thế các locus globulin miễn dịch nội sinh, hoặc trong đó là nhiễm sắc thể ngoài đang tồn tại hoặc được tích hợp ngẫu nhiên trong các nhiễm sắc thể của động vật. Trong chuột chuyển gen này, các locus globulin miễn dịch nội sinh nói chung chưa từng được kích hoạt. Để xem xét về các phương pháp để đạt được các kháng thể người từ các động vật chuyển gen, xem Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Xem thêm, ví dụ, US 6,075,181 và US 6,150,584 mô tả kỹ thuật XENOMOUSE™; US 5,770,429 mô tả kỹ thuật HUMAB®; US 7,041,870 mô tả kỹ thuật K-M MOUSE®, và US 2007/0061900, mô tả kỹ thuật VELOCI MOUSE®). Các vùng biến đổi người từ các kháng thể còn nguyên vẹn được tạo ra bằng các động vật này có thể còn được biến đổi, ví dụ, bởi sự kết hợp với vùng ổn định người khác nhau.

Các kháng thể người cũng có thể được làm bằng các phương pháp dựa vào tế bào lai. U tủy người và các dòng tế bào dị u tủy chuột-người để sản xuất các kháng thể người đơn dòng đã từng được mô tả. (Xem, ví dụ, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Các kỹ thuật Sản xuất Kháng thể đơn dòng và các ứng dụng, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).). Các kháng thể người được tạo

ra nhờ kỹ thuật tế bào lai tế bào B người cũng được mô tả trong Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Các phương pháp bổ sung bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong US 7,189,826 (mô tả quy trình sản xuất các kháng thể IgM người đơn dòng từ các dòng tế bào lai) và Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (mô tả các tế bào lai người-người). Kỹ thuật tế bào lai người (kỹ thuật Trioma) cũng được mô tả trong Vollmers và Brandlein, Histology và Histopathology, 20(3):927-937 (2005) và Vollmers và Brandlein, Methods and Findings in Thử nghiệm và Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Các kháng thể người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi vô tính Fv được chọn từ các thư viện hiển thị thể thực khuẩn gốc người. Sau đó, các trình tự miền biến đổi này có thể được kết hợp với một miền ổn định người mong muốn. Các kỹ thuật để chọn lựa các kháng thể người từ các thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

5. Các kháng thể có nguồn gốc từ thư viện

Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách quét tổ hợp các thư viện đối với các kháng thể với hoạt tính hoặc các hoạt động mong muốn. Ví dụ, một loạt các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để tạo ra các thư viện hiển thị thể thực khuẩn và việc quét các thư viện này đối với các kháng thể có các đặc tính gắn kết mong muốn. Các phương pháp này được xem xét, ví dụ, trong Hoogenboom et al. trong Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và còn được mô tả, ví dụ, trong McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks và Bradbury, trong Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Người Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

101(34): 12467-12472 (2004); và Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004).

Trong các phương pháp hiển thị thể thực khuẩn bất kỳ, các kho gen VH và VL được tạo vô tính riêng biệt bằng phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) và được tái kết hợp ngẫu nhiên trong các thư viện thể thực khuẩn, mà sau đó có thể được thử nghiệm về thể thực khuẩn gắn kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Thể thực khuẩn điển hình là các đoạn kháng thể hiển thị, hoặc như các đoạn Fv chuỗi đơn (scFv) hoặc như các đoạn Fab. Các thư viện từ các nguồn được gây miễn dịch cung cấp các kháng thể ái lực cao cho gen miễn dịch mà không có yêu cầu về cấu trúc tế bào lai. Ngoài ra, kho chưa từng được đem ra thí nghiệm có thể được vô tính (ví dụ, từ người) để cung cấp nguồn duy nhất của các kháng thể đến một phạm vi rộng của cùng và không cùng các kháng nguyên mà không có sự tạo miễn dịch nào như được mô tả bởi Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, các thư viện chưa từng được đem ra thí nghiệm cũng có thể được làm tổng hợp bằng cách vô tính các đoạn gen V- không được tái sắp xếp từ các tế bào gốc, và bằng cách sử dụng các đoạn môi PCR có chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa các vùng CDR3 biến đổi cao và để hoàn thành sự tái sắp xếp *in vitro*, như được mô tả bởi Hoogenboom và Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Các công bố sáng chế mô tả các thư viện thể thực khuẩn kháng thể người bao gồm, ví dụ: US 5,750,373, và US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 và US 2009/0002360.

Các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể phân lập từ các thư viện kháng thể người được coi là các kháng thể người hoặc các đoạn kháng thể người ở đây.

6. Các kháng thể đa hiệu

Theo các phương án bất kỳ, kháng thể được cung cấp ở đây là kháng thể đa hiệu, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đa hiệu là các kháng thể đơn

dòng mà gắn kết đặc hiệu với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo các phương án bất kỳ, một trong số các đặc hiệu gắn kết là cho FAP và các đặc hiệu khác đối với kháng nguyên bất kỳ. Theo các phương án bất kỳ, các kháng thể đặc hiệu kép có thể gắn kết với hai epitop khác nhau của FAP. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể cũng được sử dụng cho các tác nhân gây độc cục bộ để các tế bào trong đó biểu hiện FAP. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được điều chế như kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc các đoạn kháng thể.

Các kỹ thuật để tạo ra các kháng thể đa hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đồng biểu hiện tái tổ hợp của hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch có các đặc hiệu khác nhau (xem Milstein và Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), WO 93/08829, và Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), và xử lý “khóa-trong-lỗ” (xem, ví dụ, US 5,731,168). Các kháng thể đa hiệu cũng có thể được làm bằng cách xử lý các hiệu ứng dẫn hướng tĩnh điện học để tạo thành các phân tử dị nhị trùng Fc kháng thể (WO 2009/089004A1); liên kết ngang hai hoặc nhiều hơn các kháng thể hoặc các đoạn (xem, ví dụ, US 4,676,980, và Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)); bằng cách sử dụng các khóa kéo leuxin để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)); bằng cách sử dụng kỹ thuật “mảnh kháng thể dime” để tạo thành các đoạn kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); và bằng cách sử dụng các chất nhị trùng chuỗi đơn Fv (scFv) (xem, ví dụ, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); và chuẩn bị các kháng thể ba đặc hiệu như đã được mô tả, ví dụ, trong Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Các kháng thể được xử lý với ba vị trí gắn kết kháng nguyên chức hoặc nhiều hơn, bao gồm cả “các kháng thể Octopus,” cũng được đề cập thuộc phạm vi sáng chế (xem, ví dụ, US 2006/0025576A1).

Kháng thể hoặc đoạn kháng thể ở đây cũng bao gồm “FAB hoạt động kép” hoặc “DAF” bao gồm một vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết với FAP cũng như kháng nguyên khác nhau khác (xem, ví dụ US 2008/0069820).

7. Các biến thể kháng thể

Theo các phương án bất kỳ, các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể được cung cấp ở đây được dự tính. Ví dụ, nó có thể có khả năng mong muốn để cải thiện ái lực gắn kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được điều chế bằng cách đưa những sự thay đổi thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Những sự thay đổi này bao gồm, ví dụ, loại bỏ từ, và/hoặc chèn vào trong và/hoặc những sự thay thế của các gốc trong các trình tự axit amin của kháng thể. Sự kết hợp bất kỳ của loại bỏ, chèn vào, và thay thế có thể được làm để đạt được cấu trúc cuối cùng, được cung cấp rằng cấu trúc trạng thái cuối cùng sở hữu các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết kháng nguyên.

a) Các biến thể thay thế, chèn vào và loại bỏ

Theo các phương án bất kỳ, các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được cung cấp. Các vị trí tham gia vào quá trình đột biến thay thế bao gồm các HVR và FR.

Những sự thay thế axit amin có thể dẫn đến sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có các đặc tính cấu trúc và/hoặc hóa học tương tự, ví dụ, các thay thế axit amin bảo tồn. Những sự thay thế axit amin "bảo tồn" có thể được làm trên cơ sở sự giống nhau về tính phân cực, sự tích điện, tính tan, tính kỵ nước, tính thấm nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc có liên quan. Ví dụ, các axit amin không cực (kỵ nước) bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, phenylalanin, tryptophan, và methionin; các axit amin trung tính phân cực bao gồm serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin; các axit amin được nạp điện dương (tính bazơ) bao gồm arginin, lyzin, và histidin; và các axit amin được nạp điện âm (tính axit) bao gồm axit aspartic và axit glutamic. Những sự

thay thế bảo tồn được thể hiện trong Bảng 2 dưới tiêu đề "những sự thay thế được ưu tiên.". Các thay đổi đáng kể hơn được cung cấp trong Bảng 2 dưới tiêu đề "những sự thay thế làm ví dụ," và còn như được mô tả dưới đây để tham khảo với các lớp chuỗi bên axit amin. Những sự thay thế axit amin có thể được đưa vào trong kháng thể liên quan và các sản phẩm đã thử nghiệm cho hoạt tính mong muốn, ví dụ, gắn kết kháng nguyên được duy trì/được cải thiện, khả năng miễn dịch gen được giảm, hoặc ADCC hoặc CDC được cải thiện.

Bảng 2.

Gốc nguyên gốc	Những thay thế làm ví dụ	Những thay thế ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Các axit amin có thể được nhóm lại theo các đặc tính chuỗi bên thông thường:

- (1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) thâm hút trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) tính axit: Asp, Glu;
- (4) tính bazơ: His, Lys, Arg;
- (5) các gốc ảnh hưởng sự định hướng chuỗi: Gly, Pro;
- (6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Những sự thay thế không bảo tồn sẽ gây ra sự trao đổi một bộ phận của một trong các lớp này cho lớp khác. Ví dụ, những sự thay thế axit amin cũng có thể tạo ra sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có các đặc tính cấu trúc và/hoặc hóa học khác nhau, ví dụ, sự thay thế một axit amin từ một nhóm (ví dụ, phân cực) bằng axit amin khác từ một nhóm khác (ví dụ, tính bazơ). Biến thể có thể được cho phép để được xác định thử nghiệm bằng cách tạo thành có tính hệ thống chèn vào, loại bỏ, hoặc những sự thay thế của axit amins trong một phân tử polypeptit bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và thử nghiệm các biến thể tái tổ hợp tạo thành về hoạt tính.

Một loại biến thể thay thế bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều các gốc vùng siêu biến đổi của một kháng thể mẹ (ví dụ, kháng thể người hoặc được làm tương thích với người). Nói chung, các biến thể tạo thành được chọn để nghiên cứu tiếp sẽ có những sự thay đổi (ví dụ, những cải thiện) về các đặc tính sinh học nào đó (ví dụ, ái lực tăng, khả năng miễn dịch gen giảm) có liên quan đến kháng thể mẹ và/hoặc sẽ được duy trì đáng kể các đặc tính sinh học nào đó của kháng thể mẹ. Biến thể thay thế làm ví dụ là một kháng thể ái lực hoàn thiện, trong đó có thể được tạo ra theo cách thông thường, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật hoàn thiện ái lực dựa vào hiển thị thể thực khuẩn như được mô tả ở đây. Trong một thời gian ngắn, một hoặc nhiều các gốc HVR là các kháng thể

đã trưởng thành và biến thể được hiển thị trên thể thực khuẩn và được thử nghiệm về hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết).

Các thay đổi (ví dụ, những thay thế) có thể được làm trong HVRs, ví dụ, để cải thiện ái lực kháng thể. Các thay đổi này có thể được làm trong HVR “các điểm nóng,” tức là, các gốc được mã hóa bằng các codon trải qua đột biến ở tần số cao trong suốt quá trình trưởng thành xôma (xem, ví dụ, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), và/hoặc các SDR (a-CDRs), với biến thể tạo thành VH hoặc VL đang được thử nghiệm về ái lực gắn kết. Sự hoàn thiện ái lực bằng cách tạo cấu trúc và tái chọn lựa từ các thư viện thứ cấp đã được được mô tả, ví dụ, trong Hoogenboom et al. in *Methods in Phage Display* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) Theo một số phương án của sự hoàn thiện ái lực, tính đa dạng được đưa vào trong các gen cải biến được chọn đối với sự trưởng thành bằng một loạt các phương pháp bất kỳ (ví dụ, PCR xảy ra lỗi, sự dao động chuỗi, hoặc quá trình đột biến trực tiếp oligonucleotit). Sau đó, một thư viện thứ cấp được tạo ra. Sau đó, thư viện được thử nghiệm để xác định các biến thể kháng thể bất kỳ với ái lực mong muốn. Phương pháp khác để mở đầu tính đa dạng bao gồm các cách tiếp cận trực tiếp HVR-, trong đó một vài các gốc HVR (ví dụ, 4 đến 6 các gốc ở một thời điểm) được tạo ngẫu nhiên. Các gốc HVR có liên quan đến gắn kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng quá trình đột biến hoặc mô hình quét alanin. CDR-H3 và CDR-L3 đặc biệt được hướng đích trong nhiều trường hợp.

Theo các phương án bất kỳ, những sự thay thế, chèn vào, hoặc loại bỏ có thể xảy ra trong một hoặc nhiều HVRs miễn là các thay đổi này làm giảm không đáng kể khả năng của kháng thể gắn kết kháng nguyên. Ví dụ, các thay đổi bảo tồn (ví dụ, những thay thế bảo tồn như được cung cấp ở đây) mà làm giảm không đáng kể ái lực gắn kết có thể được làm trong HVRs. Các thay đổi này có thể là ở bên ngoài HVR “các điểm nóng” hoặc các SDR. Theo các phương án

bất kỳ của biến thể các trình tự VH và VL được cung cấp ở trên, mỗi HVR hoặc không bị thay đổi, hoặc chứa không quá một, hai hoặc ba sự thay thế axit amin.

Một phương pháp hữu ích để nhận ra các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể được hướng đích để quá trình đột biến được gọi là "quá trình đột biến quét alanin" như được mô tả bởi Cunningham và Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Theo phương pháp này, một gốc hoặc nhóm của các gốc đích (ví dụ, các gốc được tích điện như Arg, Asp, His, Lys, và Glu) được xác định và được thay thế bằng một axit amin được tích điện trung tính hoặc âm tính (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định tiếp sự tương tác của kháng thể với kháng nguyên chịu ảnh hưởng. Những sự thay thế nữa có thể được đưa vào ở các vị trí axit amin thể hiện độ nhạy chức với những thay thế ban đầu. Ngoài ra, hoặc hơn nữa, nó có thể có lợi để phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để xác định các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc liền kề có thể được hướng đích hoặc bị cắt bỏ như các gốc đại diện điển hình để thay thế. Các biến thể có thể được thử nghiệm để xác định tiếp xem liệu chúng có chứa các đặc tính mong muốn hay không.

Trình tự axit amin chèn vào bao gồm các tổ hợp đầu amino- và/hoặc cacboxyl- dọc theo chiều dài từ một gốc đến các polypeptit có chứa một trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như sự chèn vào trong trình tự của các gốc axit amin duy nhất hoặc phức tạp. Các ví dụ về các chèn vào đầu bao gồm kháng thể với gốc metionyl đầu N-. Các biến thể chèn vào khác của phân tử kháng thể bao gồm sự hợp nhất với đầu N- hoặc C- của kháng thể với một enzym (ví dụ, đối với DEPT) hoặc một polypeptit trong đó tăng chu kỳ bán hủy huyết thanh của kháng thể.

b) Các biến thể glycosyl hóa

Theo một số phương án, những sự thay đổi của oligosacarit trong kháng thể theo sáng chế có thể được làm để tạo ra các biến thể kháng thể với các đặc tính được cải thiện nhất định.

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp các glycoform của các kháng thể kháng FAP có chức năng phản ứng tăng, bao gồm cả tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Xử lý glycosyl hóa của các kháng thể đã được mô tả trước đây. Xem, ví dụ, US 6,602,684, được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ. Các phương pháp về các kháng thể kháng FAP tạo ra từ các tế bào chủ đã được biến đổi hoạt tính của các gen có liên quan đến glycosyl hóa cũng được mô tả chi tiết ở đây (xem, ví dụ, tiêu đề rút gọn “Các phương pháp tái tổ hợp và các chế phẩm” dưới đây).

Phân tử IgG mang hai oligosacarit liên kết N trong vùng Fc của nó, một trên mỗi chuỗi nặng. Như glycoprotein bất kỳ, kháng thể được tạo ra như một mức độ phân bố của các glycoform trong đó chia đều cùng xương sống polypeptit nhưng có các oligosacarit khác nhau được gắn kèm với các vị trí glycosyl hóa. Các oligosacarit thông thường được phát hiện trong vùng Fc của IgG huyết thanh là của phức hợp typ hai râu (Wormald et al., *Biochemistry* 36:130-38 (1997), với một mức độ thấp của axit sialic đầu mút và N-acetylglucosamin cắt đôi (GlcNAc), và độ biến thiên của galactosyl đầu mút và fucosyl hóa phần lõi (fucoza được gắn kèm với một gốc GlcNAc trong “trực hệ” của cấu trúc oligosacarit hai râu). Một vài nghiên cứu đề xuất rằng cấu trúc cacbohydrat tối thiểu yêu cầu đối gắn kết với FcγR nằm trong lõi oligosacarit. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996).

Các dòng tế bào có nguồn gốc chuột hoặc chuột đồng được sử dụng trong công nghiệp và lý thuyết để sản xuất các kháng thể thông thường gắn kết các yếu tố quyết định oligosacarit phụ thuộc với các vị trí Fc. Các IgG đã biểu hiện sự thiếu hụt các dòng tế bào này, tuy nhiên, GlcNAc cắt đôi được phát hiện với lượng thấp trong các IgG huyết thanh. Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). Trong phương pháp glycosyl hóa liên kết N, GlcNAc cắt đôi được bổ sung bởi GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986).

Umaña et al. đã sử dụng một dòng tế bào CHO tạo ra kháng thể, duy nhất đã được xử lý trước để biểu hiện, theo một kiểu được điều chỉnh theo bên ngoài, các mức độ khác nhau về gen enzym GnTIII nhân dòng (Umaña, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Phương pháp này được thiết lập cho sự tương quan chặt chẽ lần thứ nhất giữa biểu hiện của glycosyltransferaza (ví dụ, GnTIII) và hoạt tính ADCC của kháng thể đã biến đổi. Nhờ đó, sáng chế dự tính các kháng thể kháng FAP, bao gồm vùng Fc hoặc vùng tương đương với vùng Fc có glycosyl hóa được biến đổi tạo ra từ sự thay đổi mức độ biểu hiện của một gen glycosyltransferaza trong tế bào chủ tạo ra kháng thể. Theo một phương án cụ thể, sự thay đổi về mức độ biểu hiện gen là tăng về hoạt tính GnTIII. Hoạt tính GnTIII tăng tạo ra việc tăng về tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit được cắt đôi, cũng như làm giảm về tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit được fucosyl hóa, trong vùng Fc của kháng thể. Kháng thể này, hoặc đoạn của chúng, có ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và chức năng phản ứng tăng.

Các kháng thể được cung cấp với các oligosacarit được cắt đôi, ví dụ, trong đó một oligosacarit hai râu được gắn kèm với vùng Fc của kháng thể được cắt đôi bằng GlcNAc. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng ADCC được fucosyl hóa và/hoặc được cải thiện giảm. Các ví dụ về các biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); US 6,602,684 (Umaña et al.); và US 2005/0123546 (Umaña et al.).

Theo một phương án, các kháng thể kháng FAP theo sáng chế có một tỷ lệ các oligosacarit được cắt đôi tăng trong vùng Fc như một kết quả của sự thay đổi các oligosacarit của chúng bằng các phương pháp theo sáng chế. Theo một phương án, tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit được cắt đôi liên kết N trong vùng Fc của các kháng thể kháng FAP theo sáng chế ít nhất là khoảng 10% đến khoảng 100%, cụ thể là ít nhất khoảng 50%, đặc biệt hơn là, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, hoặc ít nhất khoảng 90 đến 95%

của tổng số các oligosacarit. Các oligosacarit được cắt đôi có thể là của typ phức hợp hoặc thể lai.

Theo một phương án khác, các kháng thể kháng FAP theo sáng chế có một tỷ lệ tăng về các oligosacarit không fucosyl hóa trong vùng Fc như một kết quả của sự thay đổi các oligosacarit của chúng bằng các phương pháp theo sáng chế. Theo một phương án, tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit không fucosyl hóa ít nhất là khoảng 20% đến khoảng 100%, cụ thể là ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60% đến khoảng 70%, và đặc biệt hơn là, ít nhất khoảng 75%. Các oligosacarit không fucosyl hóa có thể là của typ phức hợp hoặc thể lai.

Lượng của fucoza được xác định bằng cách tính lượng trung bình của fucoza trong chuỗi đường ở Asn297, có liên quan đến tổng số của tất cả các cấu trúc glyco được gắn kèm với Asn 297 (ví dụ, các cấu trúc manosa cao và phức hợp, lai) như được đo bằng phổ khối MALDI-TOF, ví dụ như được mô tả trong WO 2008/077546. Asn297 đề cập đến gốc asparagin được định vị ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (việc đánh số EU của các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 có thể cũng được định vị khoảng ± 3 axit amin ngược dòng hoặc xuôi dòng của vị trí 297, tức là, giữa các vị trí 294 và 300, do các trình tự biến thể thứ yếu trong các kháng thể. Lượng có liên quan của fucoza là tỷ lệ phần trăm của các cấu trúc có chứa fucoza có liên quan đến toàn bộ cấu trúc glyco được xác định trong một mẫu được xử lý F N-Glycosidaza (ví dụ, các cấu trúc manosa cao và phức hợp, lai) bởi MALDI-TOF MS. Các biến thể fucosyl hóa này có thể có chức năng ADCC được cải thiện.

Phương pháp xử lý bằng glycogen có thể được sử dụng với các kháng thể kháng FAP theo sáng chế đã được mô tả chi tiết hơn trong US 6,602,684, US 2004/0241817 A1, US 2003/0175884 A1, US 60/441,307 và WO 2004/065540, toàn bộ nội dung của mỗi trong số mà trong đó được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ. Các kháng thể kháng FAP theo sáng chế còn có thể được xử lý bằng glycogen để có các gốc fucoza giảm trong vùng Fc theo

các kỹ thuật được bộc lộ trong US 2003/0157108 (Genentech), hoặc trong EP 1 176 195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 và US 2003/0115614, US 2004/093621, US 2004/110282, US 2004/110704, US 2004/132140, Niwa et al., J Immunol Methods 306, 151/160 (2006), US 6,946,292 (Kyowa). Các kháng thể kháng FAP được xử lý bằng glycogen theo sáng chế có thể cũng được tạo ra trong các hệ thống biểu hiện trong đó tạo ra các protein biến đổi glyco, như được tìm thấy trong US 60/344,169 và WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) hoặc trong WO 2004/057002 và WO 2004/024927 (Greenovation).

Các ví dụ về các công bố có liên quan đến các biến thể kháng thể “khử fucosyl hóa” hoặc “thiếu hụt fucoza” bao gồm: WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2002/0164328; US 2004/0109865; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Các ví dụ về các dòng tế bào có khả năng tạo ra các kháng thể khử fucosyl hóa bao gồm các tế bào thiếu hụt về protein fucosyl hóa Lec13 CHO (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); US 2003/0157108 A1, Presta, L; và WO 2004/056312 A1, Adams et al., đặc biệt ở Ví dụ 11), và các dòng tế bào gây mê, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, FUT8, các tế bào CHO gây mê (xem, ví dụ, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kvaa, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); và WO2003/085107).

Theo một phương án cụ thể, các kháng thể kháng FAP theo sáng chế có tỷ lệ tăng về các oligosacarit không fucosyl hóa được cắt đôi trong vùng Fc. Các oligosacarit không fucosyl hóa được cắt đôi có thể hoặc là thể lai hoặc phức hợp. Cụ thể là, các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể kháng FAP trong đó ít nhất khoảng 10% đến khoảng 100%, cụ thể là ít nhất khoảng 15%, đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 20% đến khoảng 25%, và đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 30% đến khoảng 35% của các oligosacarit trong vùng

Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên được cắt đôi, không fucosyl hóa. Các kháng thể kháng FAP theo sáng chế cũng có thể bao gồm vùng Fc trong đó ít nhất khoảng 10% đến khoảng 100%, cụ thể là ít nhất khoảng 15%, đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 20% đến khoảng 25%, và đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 30% đến khoảng 35% các oligosacarit trong vùng Fc của kháng thể là thể lai không fucosyl hóa được cắt đôi.

Theo các phương án bất kỳ, kháng thể được cung cấp ở đây được biến đổi để làm tăng hoặc làm giảm phạm vi đề trong đó kháng thể được glycosyl hóa. Việc bổ sung hoặc loại bỏ các vị trí glycosyl hóa cho kháng thể có thể được hoàn thành thông thường bằng cách biến đổi trình tự axit amin để một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc bị loại bỏ.

Các biến thể kháng thể với ít nhất một gốc galactosa trong oligosacarit được gắn kèm với vùng Fc cũng được cung cấp. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC được cải thiện. Các biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

Việc tăng về ADCC hoặc các chức năng phản ứng khác của các kháng thể kháng FAP theo sáng chế cũng có thể đạt được bằng cách tăng cường ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên cho FAP, ví dụ bằng sự hoàn thiện ái lực hoặc các phương pháp khác để cải thiện ái lực (xem Tang et al., J. Immunol. 2007, 179:2815-2823), hoặc bằng những sự thay đổi axit amin trong vùng Fc như được mô tả dưới đây. Các sự kết hợp của các phương pháp này cũng được bao gồm trong sáng chế.

c) Các biến thể vùng Fc

Theo các phương án bất kỳ, một hoặc nhiều những sự thay đổi axit amin có thể được đưa vào trong vùng Fc của kháng thể được cung cấp ở đây, như đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc người (ví

dự, vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 người) bao gồm sự thay đổi axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án bất kỳ, sáng chế dự tính biến thể kháng thể có trạng thái sở hữu một vài nhưng không phải là toàn bộ các chức năng phản ứng, trong đó làm cho nói đại diện tiêu biểu thích hợp cho các ứng dụng trong đó chu kỳ bán hủy của kháng thể *in vivo* là các chức năng phản ứng nào đó quan trọng (như sự bổ sung và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Các tính gây độc thử nghiệm *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được kiểm soát để xác nhận sự giảm/suy yếu của các hoạt động CDC và/hoặc ADC. Ví dụ, các thử nghiệm gắn kết (FcR) thụ thể Fc có thể được kiểm soát để đảm bảo rằng các thiếu hụt gắn kết FcγR kháng thể (còn được coi là hoạt tính ADCC), nhưng vẫn có khả năng gắn kết FcRn. Các tế bào sơ cấp làm trung gian các tế bào ADCC, NK, chỉ biểu thị FcγRIII, trong khi các đơn nhân bạch cầu biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. FcR biểu hiện về các tế bào hematopoietin được tóm tắt trong Bảng 3 ở trang 464 của Ravetch và Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Các ví dụ không giới hạn về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của một phân tử đáng chú ý được mô tả trong US 5,500,362 (xem, ví dụ, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) và Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (xem Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Ngoài ra, các phương pháp không phóng xạ có thể được thực hiện (xem, ví dụ, thử nghiệm tính gây độc không phóng xạ ACTI™ đối với phân tích tế bào theo dòng chảy (Kỹ thuật Tế bào, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm tính gây độc không phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Các tế bào phản ứng hữu ích cho các thử nghiệm bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào chết tự nhiên (NK). Ngoài ra, hoặc hơn nữa, hoạt tính ADCC của phân tử quan trọng có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như được bộc lộ trong Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Các thử nghiệm gắn kết C1q cũng có thể được tiến hành để xác nhận rằng kháng thể

không thể gắn kết C1q và do đó thiếu hụt hoạt tính CDC. Xem, ví dụ, gắn kết ELISA C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá kích hoạt bổ sung, một thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); và Cragg, M.S. và M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Gắn kết FcRn và xác định khoảng trống/chu kỳ bán hủy *in vivo* cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Các kháng thể với chức năng phản ứng giảm bao gồm các kháng thể với sự thay thế của một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (US 6,737,056). Các đột biến Fc này bao gồm các đột biến Fc với những sự thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm cả đột biến Fc "DANA" với sự thay thế của các gốc 265 và 297 tới alanin (US Patent No. 7,332,581).

Các biến thể kháng thể nhất định với gắn kết được cải thiện hoặc được giảm bớt với FcRs được mô tả. (Xem, ví dụ, US 6,737,056; WO 2004/056312, và Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).)

Theo các phương án bất kỳ, biến thể kháng thể bao gồm vùng Fc với một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong đó cải thiện ADCC, ví dụ, những thay thế ở các vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (đánh số EU của các gốc).

Theo một số phương án, các thay đổi được tạo ra trong vùng Fc dẫn tới được biến đổi (tức là, hoặc được cải thiện hoặc được giảm bớt) gắn kết C1q và/hoặc Tính gây độc phụ thuộc bổ sung (CDC), ví dụ, như được mô tả trong US 6,194,551, WO 99/51642, và Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Các kháng thể có nửa thời gian tồn tại tăng và cải thiện gắn kết với thụ thể Fc neonatal (FcRn), trong đó chịu trách nhiệm truyền IgGs mẹ đến bào thai

(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) và Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), được mô tả trong US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Các kháng thể này bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều sự thay thế trong đó cải thiện gắn kết của vùng Fc với FcRn. Các biến thể Fc này bao gồm các biến thể có những sự thay thế ở một hoặc nhiều vùng Fc các gốc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, thay thế vùng Fc gốc 434 (US 7,371,826).

Đối với các ví dụ nữa có liên quan đến các biến thể vùng Fc cũng có trong US 60/439,498; US 60/456,041; US 60/514,549; hoặc WO 2004/063351 (biến thể vùng Fcs có ái lực gắn kết tăng do sự thay đổi axit amin); hoặc US 10/672,280 hoặc WO 2004/099249 (các biến thể Fc có gắn kết được biến đổi với FcγR do sự thay đổi axit amin), Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); US 5,648,260; US 5,624,821; và WO 94/29351.

d) Các biến thể kháng thể được xử lý xystein

Theo các phương án bất kỳ, có thể được mong muốn để tạo các kháng thể được xử lý xystein, ví dụ, “thioMAbs,” trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thế bằng các gốc xystein. Cụ thể là các phương án, các gốc được thế xảy ra ở các vị trí của kháng thể có thể tới được. Bằng việc thay thế các gốc này bằng xystein, do đó các nhóm thiol phản ứng được đặt vị trí ở các vị trí của kháng thể có thể tới được và có thể được sử dụng để tiếp hợp kháng thể với các gốc khác, như các gốc thuốc hoặc các gốc liên kết thuốc, để tạo thể tiếp hợp kháng thể, như được mô tả theo sáng chế. Theo các phương án bất kỳ, một hoặc nhiều gốc bất kỳ sau đây có thể được thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số EU) của chuỗi nặng vùng Fc. Các kháng thể được xử lý xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong US 7,521,541.

e) Các dẫn xuất kháng thể

Theo các phương án bất kỳ, kháng thể được cung cấp ở đây có thể còn được biến đổi để chứa các gốc không có protein bổ sung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có sẵn. Các gốc phù hợp để điều chế kháng thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các polyme có thể hòa tan trong nước. Các ví dụ không giới hạn về các polyme có thể hòa tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các đồng polyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymethylceluloza, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, etylen/maleic đồng polyme anhydrit, các poly axit amin (hoặc các homopolyme hoặc các đồng polyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, các homopolyme propylen glycol, polypropylen oxit/etylen oxit các đồng polyme, các polyol được polyoxyetylat (ví dụ, glyxerol), polyvinyl alcohol, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có các thuận lợi trong quá trình sản xuất do sự ổn định trong nước của nó. Polyme có thể là ở trọng lượng phân tử bất kỳ, và có thể được phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số các polyme được gắn kèm với kháng thể có thể khác nhau, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn kèm, chúng có thể có cùng hoặc khác phân tử. Nói chung, số và/hoặc loại các polyme được sử dụng để điều chế có thể được xác định dựa vào các tính toán bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đặc tính hoặc các chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, dù dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng trong các điều kiện đã xác định theo điều trị, v.v..

Theo một phương án khác, các thể tiếp hợp của kháng thể và không có gốc protein có thể được gia nhiệt chọn lọc bằng chi tiếp xúc với sự bức xạ được cung cấp. Theo một phương án, gốc không có protein là cacbon nanotube (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). Sự bức xạ có thể là của độ dài sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các độ dài sóng không gây hại cho các tế bào bình thường, mà trong đó việc gia nhiệt gốc không

có protein đến mức nhiệt mà trong đó các tế bào gần với kháng thể gốc không có protein bị tiêu diệt.

B. Các phương pháp tái tổ hợp và các chế phẩm

Các kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp và các chế phẩm tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong US 4,816,567. Theo một phương án, polynucleotit phân lập mã hóa kháng thể kháng FAP đã mô tả ở đây được cung cấp. Polynucleotit này có thể mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL và/hoặc trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể (ví dụ, các chuỗi nặng và/hoặc nhẹ của kháng thể). Theo một phương án nữa, một hoặc nhiều vector (ví dụ, các vector vô tính hoặc các vector biểu hiện) bao gồm polynucleotit này được cung cấp. Theo một phương án nữa, tế bào chủ bao gồm polynucleotit này hoặc vector này được cung cấp. Theo phương án này, tế bào chủ bao gồm (ví dụ, đã được biến đổi bằng): (1) vector bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể (ví dụ, vector polycistronic), hoặc (2) vector thứ nhất bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và vector thứ hai bao gồm polynucleotit mã hóa trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào eukaryote, cụ thể là tế bào động vật có vú, ví dụ, Bùng trướng Chuột đồng Trung Quốc (CHO), bầu dục chuột đồng nhỏ (BHK) tế bào hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, phương pháp tạo thành kháng thể kháng FAP được cung cấp, trong đó phương pháp bao gồm việc nuôi tế bào chủ bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể, như được cung cấp ở trên, dưới các điều kiện phù hợp cho sự biểu hiện của kháng thể, và tùy ý phục hồi kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi tế bào chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng FAP, một hoặc nhiều polynucleotit(s) mã hóa kháng thể, ví dụ, như được mô tả ở trên, được phân lập và được chèn vào trong một hoặc nhiều vector để vô tính và/hoặc biểu hiện tiếp

trong tế bào chủ. Các phương pháp trong đó là đã biết đối với người cso trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng cho cấu trúc các vector biểu hiện có chứa trình tự mã hóa của kháng thể kháng FAP cùng với các tín hiệu kiểm soát sự sao chép/chuyển dịch thích hợp. Các phương pháp này bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN *in vitro*, các kỹ thuật tổng hợp và tái kết hợp *in vivo*/tái kết hợp gen. Xem, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) và Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates và Wiley Interscience, N.Y (1989).

Theo một phương án, một hoặc một vài polynucleotit mã hóa kháng thể kháng FAP có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của chất hoạt hóa chủ yếu hoặc, ngoài ra, hệ thống biểu hiện được kiểm soát. Các hệ thống biểu hiện được kiểm soát phù hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hệ thống biểu hiện được kiểm soát tetracyclin, hệ thống biểu hiện suy diễn hoóc môn kích thích sự tăng trưởng, hệ thống biểu hiện chuyển đổi lac, hệ thống biểu hiện suy diễn hormon kháng viêm, hệ thống hoạt hóa suy diễn nhiệt độ, và hệ thống biểu hiện suy diễn kim loại metallothionein. Nếu một vài polynucleotit mã hóa kháng thể khác nhau theo sáng chế được bao gồm trong hệ thống tế bào chủ, một số của chúng có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của một chất hoạt hóa cơ bản, trong khi các loại khác được biểu hiện dưới sự kiểm soát của chất hoạt hóa được kiểm soát.

Các tế bào chủ phù hợp cho sự vô tính hoặc biểu hiện của các vector mã hóa kháng thể bao gồm các tế bào nhân sơ và nhân thực được mô tả theo sáng chế. Ví dụ, các kháng thể có thể được tạo ra trong vi khuẩn, cụ thể là khi chức năng phản ứng glycosyl hóa và Fc là không cần thiết. Đối với sự biểu hiện của các đoạn kháng thể và các polypeptit trong vi khuẩn, xem, ví dụ, US 5,648,237, US 5,789,199 và US 5,840,523. (cũng xem Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-

254, mô tả sự biểu hiện của các đoạn kháng thể trong *E. coli*). Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ hỗn hợp tế bào vi khuẩn trong một mảnh có thể hòa tan và có thể còn được tinh chế.

Ngoài ra, để các sinh vật chưa có nhân điển hình, các vi khuẩn eukaryote như nấm dạng sợi hoặc nấm men là vô tính phù hợp hoặc biểu hiện các tế bào chủ đối với các vectơ mã hóa kháng thể, bao gồm cả nấm và các giống nấm men của các chuỗi phản ứng hóa sinh glycosyl hóa đã “được làm tương thích với người”, tạo ra trong quá trình sản xuất của kháng thể với từng phần hoặc toàn bộ mẫu glycosyl hóa người. Xem Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), và Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006). Các hệ thống biểu hiện này cũng được nêu trong US 60/344,169 và WO 03/056914 (các phương pháp tạo ra glycoprotein như người trong tế bào chủ nhân thực không phải của người).

Các tế bào chủ phù hợp để biểu hiện kháng thể glycosyl hóa cũng có nguồn gốc từ các sinh vật đa bào (các động vật không có xương sống và các động vật có xương sống). Các ví dụ về các tế bào động vật không có xương sống bao gồm các tế bào thực vật và côn trùng. Nhiều giống thuộc baculovirut đã được xác định trong đó có thể được sử dụng các tế bào chung với côn trùng, cụ thể là đối với sự chuyển nhiễm của các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các tế bào nuôi cấy thực vật cũng được sử dụng làm các vật chủ. Xem, ví dụ, US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978 và US 6,417,429 (mô tả kỹ thuật PLANTIBODIESTM tạo ra các kháng thể ở các thực vật chuyển gen).

Các tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng như các vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú that được làm cho thích ứng để phát triển trong huyền phù có thể được sử dụng. Các ví dụ khác về các dòng tế bào chủ động vật có vú là dòng CV1 bầu dục khi biến đổi bởi SV40 (COS-7); dòng bầu dục phôi người (các tế bào 293 hoặc 293T như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); các tế bào bầu dục chuột đồng nhỏ

(BHK); các tế bào sertoli chuột (các tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); các tế bào bầu dục khí (CV1); các tế bào bầu dục khí xanh châu Phi (VERO-76); các tế bào ung thư biểu mô cổ người (HELA); các tế bào bầu dục chó (MDCK); các tế bào gan chuột trầu (BRL 3A); các tế bào phổi người (W138); các tế bào gan người (Hep G2); khối u vú chuột (MMT 060562); các tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); các tế bào MRC 5; và các tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm cả các tế bào DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để xem xét về các dòng tế bào chủ động vật có vú nào đó phù hợp để sản xuất kháng thể, xem, ví dụ, Yazaki và Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Biểu hiện ổn định nói chung được ưa thích để biểu hiện tạm thời vì nó là các kết quả đạt được điển hình có thể sinh sản nhiều hơn và cũng dễ phục tuyền hơn để sản xuất với quy mô lớn; tuy nhiên, nó thuộc kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để xác định tiếp biểu hiện tạm thời là tốt hơn cho tình huống cụ thể.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp để sửa đổi tiểu sử glycosyl hóa của các kháng thể kháng FAP của sáng chế được tạo ra bằng một tế bào chủ, bao gồm việc biểu hiện trong tế bào chủ này một hoặc nhiều (các) polynucleotit mã hóa kháng thể kháng FAP và một hoặc nhiều polynucleotit(s) mã hóa polypeptit bằng hoạt tính glycosyltransferaza, hoặc vector bao gồm các polynucleotit này. Nói chung, loại dòng tế bào được nuôi cấy bất kỳ, bao gồm cả các dòng tế bào đã thảo luận ở trên, có thể được sử dụng để tạo ra các dòng tế bào để sản xuất các kháng thể kháng FAP cùng với kiểu Glycosyl hóa được biến đổi. Các dòng tế bào được ưa thích bao gồm các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NS0,

các tế bào SP2/0, các tế bào u tủy YO, các tế bào u tủy chuột P3X63, các tế bào PER, các tế bào PER.C6 hoặc các tế bào lai, và các tế bào động vật có vú khác. Các polypeptit với hoạt tính glycosyltransferaza bao gồm $\beta(1,4)$ -N-axetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII), α -manosidaza II (ManII), $\beta(1,4)$ -galactosyltransferaza (GalT), $\beta(1,2)$ -N-axetylglucosaminyltransferaza I (GnTI), và $\beta(1,2)$ -N-axetylglucosaminyltransferaza II (GnTII). Theo một phương án, sự kết hợp của các polynucleotit mã hóa đối với các polynucleotit với hoạt tính glycosyltransferaza được biểu hiện trong tế bào chủ (ví dụ, GnTIII và Man II). Tương tự, phương pháp này cũng bao gồm biểu hiện của một hoặc nhiều polynucleotit(s) mã hóa kháng thể kháng FAP trong tế bào chủ trong đó gen glycosyltransferaza đã được phá vỡ hoặc hoặc mặt khác được khử kích hoạt (ví dụ, tế bào chủ trong đó hoạt tính của gen mã hóa $\alpha 1,6$ lõi fucosyltransferaza đã bị loại bỏ). Theo một phương án cụ thể, các kháng thể kháng FAP của sáng chế có thể được tạo ra trong tế bào chủ còn biểu hiện polynucleotit mã hóa một polypeptit có hoạt tính GnTIII để sửa đổi mẫu glycosyl hóa của các kháng thể này. Theo một phương án cụ thể, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit hợp nhất bao gồm miền định vị Golgi của polypeptit cư trú Golgi. Theo phương án cụ thể khác, biểu hiện của kháng thể kháng FAP theo sáng chế trong tế bào chủ biểu hiện polynucleotit mã hóa một polypeptit có hoạt tính GnTIII dẫn đến các kháng thể kháng FAP với ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và/hoặc chức năng phản ứng tăng. Theo đó, theo một phương án, sáng chế hướng tới tế bào chủ bao gồm (a) một hoặc nhiều (các) polynucleotit phân lập bao gồm trình tự mã hóa polypeptit có hoạt tính GnTIII; và (b) một hoặc nhiều (các) polynucleotit phân lập mã hóa kháng thể kháng FAP theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit hợp nhất bao gồm miền xúc tác của GnTIII và miền định vị Golgi của polypeptit nằm trong Golgi khác loại. Cụ thể là, miền định vị Golgi này là miền định vị Golgi của manosidaza II. Các phương pháp để tạo ra các polypeptit hợp nhất này và sử dụng chúng để tạo ra các kháng thể với các chức năng phản ứng tăng được bộc lộ trong WO 2004/065540, US

60/495,142 và US 2004/0241817, toàn bộ các nội dung trong đó được kết hợp rõ ràng ở đây bằng cách tham khảo. Theo một phương án khác, tế bào chủ bổ sung bao gồm polynucleotit phân lập bao gồm trình tự mã hóa một polypeptit có hoạt tính manosidaza II (ManII). Các Polynucleotit mã hóa các polypeptit, như các polynucleotit mã hóa kháng thể kháng FAP, có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của một chất hoạt hóa chủ yếu hoặc, lần lượt là, một hệ thống biểu hiện được kiểm soát. Các hệ thống này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm các hệ thống đã thảo luận ở trên.

Các tế bào chủ trong đó có chứa trình tự mã hóa của kháng thể kháng FAP và/hoặc trình tự mã hóa của các polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza, và trong đó biểu hiện các sản phẩm gen hoạt hóa sinh học có thể được xác định ví dụ, bằng sự lai giống ADN-ADN hoặc ADN-ARN; sự có mặt hoặc không có mặt của các chức năng gen "đánh dấu"; đánh giá mức độ sao chép khi được đo bằng biểu hiện của các bản sao mARN tương ứng trong tế bào chủ; hoặc sự phát hiện về sản phẩm gen khi được đo bằng thử nghiệm miễn dịch hoặc bằng hoạt tính sinh học của nó - các phương pháp trong đó đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Hoạt tính GnTIII hoặc Man II có thể được phát hiện ví dụ, bằng cách để lectin gắn kết với các sản phẩm tổng hợp sinh học của GnTIII hoặc ManII tương ứng. Một ví dụ về lectin này là lectin E₄-PHA được ưu tiên gắn kết với các oligosacarit có chứa GlcNAc cắt đôi. Các sản phẩm tổng hợp sinh học (tức là, các cấu trúc oligosacarit đặc trưng) của các polypeptit có hoạt tính GnTIII hoặc ManII cũng có thể được phát hiện bằng sự phân tích phổ khối của các oligosacarit được giải phóng từ các glycoprotein được tạo ra bằng các tế bào biểu hiện các polypeptit này. Ngoài ra, thử nghiệm chức năng trong đó đo gắn kết thụ thể Fc tăng hoặc chức năng phản ứng tăng qua trung gian bằng các kháng thể được tạo ra bằng các tế bào được xử lý bằng polynucleotit mã hóa một polypeptit có hoạt tính GnTIII có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể kháng FAP có các oligosacarit biến đổi, bao gồm (a) nuôi tế bào chủ được xử lý để biểu hiện ít nhất một polynucleotit mã hóa một polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza dưới các điều kiện trong đó cho phép sự sản xuất của kháng thể kháng FAP theo sáng chế, trong đó polypeptit này có hoạt tính glycosyltransferaza được biểu hiện với lượng đủ để sửa đổi các oligosacarit trong vùng Fc của kháng thể kháng FAP này được tạo ra bằng tế bào chủ này; và (b) phân lập kháng thể kháng FAP này. Theo một phương án, polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza là GnTIII. Theo một phương án khác, có hai polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza. Theo một phương án cụ thể, hai peptit có hoạt tính glycosyltransferaza là GnTIII và ManII. Theo một phương án khác, polypeptit có hoạt tính glycosyltransferaza là polypeptit hợp nhất bao gồm miền xúc tác của GnTIII. Theo một phương án cụ thể hơn, polypeptit hợp nhất còn bao gồm miền định vị Golgi của một polypeptit nằm trong Golgi. Cụ thể là, miền định vị Golgi là miền định vị của manosidaza II hoặc GnTI, cụ thể hơn là miền định vị của manosidaza II. Ngoài ra, miền định vị Golgi được chọn từ nhóm bao gồm: miền định vị của manosidaza I, miền định vị của GnTII, và miền định vị của α 1,6 lõi fucosyltransferaza.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng FAP biến đổi được tạo ra bằng tế bào chủ hoặc phương pháp được mô tả ở trên có vùng ổn định IgG hoặc đoạn của chúng bao gồm vùng Fc. Theo phương án cụ thể khác, kháng thể kháng FAP được làm tương thích với người hoặc kháng thể người hoặc đoạn của chúng bao gồm vùng Fc.

Kháng thể kháng FAP với glycosyl hóa được biến đổi được tạo ra bằng tế bào chủ hoặc phương pháp được mô tả ở trên điển hình là thể hiện ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và/hoặc chức năng phản ứng tăng như một kết quả của sự thay đổi của tế bào chủ (ví dụ, bởi sự biểu hiện của gen glycosyltransferaza). Tốt hơn là, ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng được tăng gắn kết với thụ thể Fc γ kích hoạt, tốt

nhất là thụ thể FcγRIIIa. Chức năng phản ứng tăng tốt hơn là tăng về một hoặc nhiều chức năng sau: tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng, thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCP), tiết xytokin tăng, kháng nguyên miễn dịch-phức hợp-quia trung gian tăng thu hút bởi các tế bào có mặt kháng nguyên, tính gây độc tế bào qua trung gian Fc tăng, các tế bào gắn kết với NK tăng, các gắn kết với đại thực bào tăng, các tế bào gắn kết với đa nhân tăng (PMNCs), các gắn kết với bạch cầu đơn nhân tăng, liên kết ngang tăng của các kháng thể gắn kết đích, tín hiệu trực tiếp gây chết tế bào tăng, sự trưởng thành tế bào đuôi gai tăng, và môi tế bào T tăng.

C. Các thử nghiệm

Các kháng thể kháng FAP được cung cấp ở đây có thể được xác định, được thử nghiệm về, hoặc được đặc trưng về các đặc tính hóa/lý và/hoặc các hoạt động sinh học của chúng bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

1. Các thử nghiệm gắn kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gắn kết kháng nguyên của chúng, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết như ELISA, Western blot, etc.

Theo khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định kháng thể cạnh tranh với kháng thể kháng FAP đặc hiệu khác về gắn kết với FAP. Theo các phương án bất kỳ, như một kháng thể cạnh tranh gắn kết với cùng epitop (ví dụ, epitop thẳng hoặc đối xứng) có gắn kết bằng kháng thể kháng FAP đặc hiệu khác này. Các phương pháp làm ví dụ chi tiết về việc sắp xếp epitop để trong đó kháng thể gắn kết được cung cấp trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," trong *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Người in Press, Totowa, NJ).

Trong một thử nghiệm cạnh tranh làm ví dụ, FAP được giữ cố định được nuôi cấy trong một dung dịch bao gồm kháng thể được gắn nhãn thứ nhất gắn

kết với FAP (ví dụ, kháng thể 3F2 được mô tả trong các Ví dụ) và kháng thể không được gắn nhãn thứ hai đang được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh của nó với kháng thể thứ nhất để gắn kết với FAP. Kháng thể có thể thứ hai có mặt trong một tế bào lai nổi. Như một sự kiểm soát, FAP được giữ cố định được nuôi cấy trong một dung dịch bao gồm kháng thể được gắn nhãn thứ nhất mà không có kháng thể không được gắn nhãn thứ hai. Sau khi nuôi cấy dưới các điều kiện cho phép gắn kết kháng thể thứ nhất với FAP, kháng thể không gắn kết dư bị loại bỏ, và lượng của nhãn liên kết với FAP được giữ cố định được đo. Nếu lượng của nhãn liên kết với FAP được giữ cố định bị giảm đáng kể trong mẫu thử nghiệm có liên quan đến mẫu kiểm soát, sau đó cho thấy rằng kháng thể thứ hai đang cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với FAP. Xem Harlow và Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch,14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Các thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được cung cấp để xác định các kháng thể kháng FAP của chúng có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, sự suy giảm của các tế bào đích, tính độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC), tính gây độc phụ thuộc bổ sung (CDC), hoặc kích thích gây chết tế bào. Các kháng thể có hoạt tính sinh học *in vivo* này và/hoặc *in vitro* cũng được cung cấp.

Theo các phương án bất kỳ, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính sinh học này. Các thử nghiệm làm ví dụ để kiểm tra ADCC được mô tả ở trước (xem phần “Các định nghĩa”: “kháng thể có ADCC tăng”) và trong Ví dụ 11. Các thử nghiệm để dò tìm sự suy giảm tế bào (ví dụ, bằng cách đo LDH giải phóng) hoặc sự tự sát của tế bào (ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm TUNEL) cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thử nghiệm để đo ADCC hoặc CDC cũng được mô tả trong WO 2004/065540 (xem Ví dụ 1 ở đây), toàn bộ nội dung trong đó được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo.

D. Các kháng thể tiếp hợp

Sáng chế cũng cung cấp các thể tiếp hợp bao gồm kháng thể kháng FAP theo sáng chế được tiếp hợp với một hoặc nhiều tác nhân gây độc, như các tác nhân hóa trị liệu hoặc các thuốc, ức chế sự phát triển các tác nhân, các độc tố (ví dụ, các độc tố protein, các độc tố hoạt tính như enzym của vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc gốc động vật, hoặc các đoạn của chúng) hoặc các đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, trong kháng thể tiếp hợp kháng thể-thuốc (ADC) được tiếp hợp cho một hoặc nhiều thuốc, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, cantansinoid (xem US 5,208,020, US 5,416,064 và EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc thuốc monomethylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem US 5,635,483 và US 5,780,588, và US 7,498,298); dolastatin; calicheamixin hoặc dẫn xuất của chúng (xem US 5,712,374, US 5,714,586, US 5,739,116, US 5,767,285, US 5,770,701, US 5,770,710, US 5,773,001 và US 5,877,296; Hinman et al., *Cancers Res.* 53:3336-3342 (1993); và Lode et al., *Cancers Res.* 58:2925-2928 (1998)); anthracyclin như daunomycin hoặc doxorubicin (xem Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); và US 6,630,579); methotrexat; vindesin; taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothecen; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp kháng thể bao gồm kháng thể theo sáng chế được tiếp hợp với một độc tố hoạt tính như enzym hoặc đoạn của chúng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, chuỗi diphtheria A, các đoạn hoạt tính không gắn kết của độc tố diphtheria, chuỗi ngoại độc tố A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modexin A, alpha-sarxin, các protein *Aleurites fordii*, các protein dianthin, các protein *Phytolaca americana*

(PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curxin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và các tricothexen.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp kháng thể bao gồm kháng thể theo sáng chế được tiếp hợp với một nguyên tử phóng xạ để tạo thành một thể tiếp hợp phóng xạ. Một loạt các đồng vị phóng xạ là có sẵn để sản xuất các thể tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} và các đồng vị phóng xạ của Lu. Khi thể tiếp hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm một nguyên tử phóng xạ đối với các nghiên cứu phương pháp ảnh nhận phóng xạ, ví dụ tc99m hoặc I123, hoặc nhãn quay đối với tạo ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được gọi là tạo ảnh cộng hưởng từ, MRI), như iot-123 bổ sung, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nito-15, oxy-17, gadôlini, magiê hoặc sắt.

Các thể tiếp hợp của kháng thể và tác nhân gây độc có thể được làm bằng cách sử dụng một loạt các tác nhân ghép protein hai chức năng như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-cacboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức năng của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt tính (như muối của axit sulfuric disuxinimidyl), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), các dẫn xuất bis-diazonium (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), các diisocyanat (như toluen 2,6-diisocyanat), và các hợp chất flo hoạt tính lặp lại (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminepentaaxetic được gắn nhãn cacbon-14 (MX-DTPA) là một tác nhân chelat làm ví dụ về sự kết hợp của radionucleotit với kháng thể. Xem WO94/11026. Cầu nối có thể là “cầu nối có thể phân chia” để dễ dàng giải phóng thuốc gây độc trong tế bào. Ví dụ, cầu nối

không bền axit, cầu nối nhạy peptidaza, cầu nối photolabil, cầu nối dimethyl hoặc cầu nối có chứa disulfit (Chari et al., Cancers Res. 52:127-131 (1992); US 5,208,020) có thể được sử dụng.

Các thể tiếp hợp kháng thể ở đây dự tính rõ ràng, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thể tiếp hợp được điều chế này với phản ứng liên kết ngang bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (suxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) trong đó là có sẵn trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Các phương pháp và các chế phẩm để chẩn đoán và phát hiện

Theo các phương án bất kỳ, các kháng thể kháng FAP bất kỳ được cung cấp ở đây là hữu ích để dò tìm sự có mặt của FAP trong một mẫu sinh học. Thuật ngữ “dò tìm” theo sáng chế bao gồm việc phát hiện về số lượng hoặc chất lượng. Theo các phương án bất kỳ, một mẫu sinh học bao gồm một tế bào hoặc mô, như các tế bào hoặc các mô từ não, vú, đại tràng, bầu dục, gan, phổi, buồng trứng, tụy, tuyến tiền liệt, cơ xương, da, ruột nhỏ, dạ dày hoặc tử cung, cũng bao gồm cả các tế bào hoặc các mô các khối u của các bộ phận của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng FAP dùng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện được cung cấp. Theo một khía cạnh nữa, phương pháp dò tìm sự có mặt của FAP trong một mẫu sinh học được cung cấp. Theo các phương án bất kỳ, phương pháp bao gồm cho mẫu sinh học tiếp xúc, tùy ý với một mẫu kiểm soát, với kháng thể kháng FAP như được mô tả ở đây dưới các điều kiện cho phép để gắn kết kháng thể kháng FAP với FAP, và dò tìm tiếp phức hợp được tạo thành giữa kháng thể kháng FAP và FAP. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể kháng FAP được sử dụng để chọn lựa các đối tượng thích hợp để điều trị với

kháng thể kháng FAP, ví dụ, trong đó FAP là đánh dấu sinh học để chọn lựa của các bệnh nhân.

Các rối loạn làm ví dụ có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế bao gồm các rối loạn liên kết với sự biểu hiện của FAP, như bệnh ung thư và các trạng thái viêm nhất định.

Theo một khía cạnh, phương pháp chẩn đoán bệnh ở một đối tượng được cung cấp, phương pháp này bao gồm việc cung cấp cho đối tượng này một lượng hữu hiệu tác nhân chẩn đoán, trong đó tác nhân chẩn đoán này bao gồm kháng thể kháng FAP như được mô tả ở đây và một nhãn, điển hình là tác nhân tạo hình ảnh, cho phép phát hiện phức hợp của tác nhân chẩn đoán này và FAP.

Theo các phương án bất kỳ, các kháng thể kháng FAP được gắn nhãn được cung cấp. Các nhãn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhãn hoặc các gốc được phát hiện trực tiếp (như huỳnh quang, màu, mật độ điện tử, quang hóa, và các nhãn phóng xạ), cũng như các gốc, như các enzym hoặc các phối tử ligan, được phát hiện gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc sự tương tác phân tử. Các nhãn làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đồng vị phóng xạ ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , và ^{131}I , các chất huỳnh quang như các chelat đất hiếm hoặc fluorescein và các dẫn xuất của nó, rôdamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, các luciferaza, ví dụ, luciferaza đom đóm và luciferaza vi khuẩn (US 4,737,456), luciferin, các 2,3-dihydrophthalazinedion, horseradish peroxidaza (HRP), phosphataza kiềm, β -galactosidaza, glucoamylaza, lizozim, các sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, các oxidaza dị vòng như uricaza và xanthin oxidaza, được ghép với một enzym sử dụng hydrogen peroxit để oxy hóa một chỉ báo đánh dấu khô như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, các nhãn, các nhãn thể thực khuẩn do vi khuẩn, các gốc tự do ổn định và các chất tương tự.

F. Các công thức được

Các công thức được của kháng thể kháng FAP theo sáng chế được điều chế bằng cách trộn kháng thể này có độ nguyên chất mong muốn với một hoặc nhiều chất mang được dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), ở dạng các công thức đông khô hoặc các dung dịch chứa nước. Các chất mang được dụng nói chung không độc để tiếp nhận ở các liều và các nồng độ sử dụng, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các chất đệm như photphat, citrat, axetat và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm cả axit ascorbic và metionin; các chất bảo quản (như octadecyldimethylbenzyl amonium clorua; hexamethonium clorua; benzalkonium clorua; benzethonium clorua; phenol, butyl hoặc benzyl alcohol; các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorcinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit (ít hơn khoảng 10 gốc) trọng lượng phân tử thấp; các protein, như huyết thanh albumin, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme thấm nước như polyvinylpyrrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lyzin; các monosacarit, disacarits, và các cacbohydrat khác bao gồm cả glucoza, mannoza, hoặc các dextrin; các tác nhân chelat như EDTA; các loại đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; các muối tạo thành các ion hoạt động như natri; các phức hợp kim loại (ví dụ, các phức hợp Zn-protein); và/hoặc các chất có hoạt tính bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang được dụng làm ví dụ ở đây còn bao gồm các tác nhân phân tán thuốc kể như các glycoprotein hyaluronidaza hoạt tính trung tính có thể hòa tan (sHASEGP), ví dụ, các glycoprotein hyaluronidaza PH-20 của người có thể hòa tan, như rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Các sHASEGP làm ví dụ và các phương pháp nhất định được sử dụng, bao gồm cả rHuPH20, được mô tả trong US 2005/0260186 và US 2006/0104968. Theo một khía cạnh, một sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminopolysacaritaza bổ sung như các chondroitinaza.

Các công thức kháng thể được làm đông khô làm ví dụ được mô tả trong US 6,267,958. Các công thức kháng thể chứa nước bao gồm các công thức được mô tả trong US 6,171,586 và WO 2006/044908, các công thức gần đây bao gồm cả hệ đệm ixtidín-axetat.

Công thức ở đây có thể cũng chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính khi cần cho dấu hiệu cụ thể cần được xử lý, tốt hơn là các thành phần có các hoạt tính bổ sung mà không gây ảnh hưởng bất lợi cho nhau. Ví dụ, nếu bệnh cần được xử lý là bệnh ung thư, nó có thể được mong muốn để cung cấp tiếp một hoặc nhiều các tác nhân kháng bệnh ung thư, ví dụ, tác nhân hóa trị liệu, chất ức chế sự tăng sinh tế bào khối u, hoặc chất hoạt hóa tế bào khối u gây chết tế bào. Các thành phần hoạt tính này có mặt phù hợp trong sự kết hợp ở các lượng hiệu quả cho mục đích được dự kiến.

Các thành phần hoạt tính có thể được bọc trong các vi nang được điều chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật côaxecva hoặc bằng sự trùng hợp xen giữa, ví dụ, hydroxymethylceluloza hoặc các vi nang gelatin và các vi nang poly-(methylmetacylat) tương ứng, trong các hệ thống phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, các thể mỡ, các vi cầu albumin, các vi nhũ tương, các phân tử nano và các viên nang nano) hoặc trong các nhũ tương thể lớn. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Các quá trình điều chế giải phóng được duy trì có thể được điều chế. Các ví dụ phù hợp về các quá trình điều chế giải phóng được duy trì bao gồm các thể mẹ bán thấm của các polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể, trong đó các thể mẹ ở dạng các vật liệu được tạo hình, ví dụ, các loại màng, hoặc các vi nang.

Các công thức được sử dụng để cung cấp *in vivo* nhìn chung là vô trùng. Sự vô trùng có thể được thực hiện nhanh, ví dụ, bằng cách lọc thông qua các màng lọc vô trùng.

Các phân tử được mô tả ở đây có thể là các dạng liều khác nhau trong đó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch lỏng hoặc huyền phù, thuốc

viên, viên thuốc, bột, thuốc đạn, các vi nang polyme hoặc các vi túi, các thể mỡ, và các dung dịch có thể tiêm hoặc có thể pha được. Dạng thích hợp phụ thuộc vào chế độ cung cấp và đơn điều trị, nhưng điển hình là các dung dịch có thể tiêm hoặc có thể pha được.

G. Phương pháp điều trị và các chế phẩm

Các kháng thể kháng FAP hoặc các công thức được bất kỳ bao gồm các kháng thể kháng FAP được cung cấp ở đây có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị.

Các kháng thể kháng FAP được cung cấp ở đây có thể được sử dụng để điều trị các bệnh đặc trưng bởi biểu hiện FAP, cụ thể là bởi biểu hiện bất thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, hoặc biểu hiện ở mẫu khác nhau trong tế bào) của FAP so với mô bình thường của cùng loại tế bào. Biểu hiện FAP bất thường (ví dụ, biểu hiện quá mức) ở nhiều khối u người so với mô không khối u của cùng loại tế bào. Nhờ đó, các kháng thể kháng FAP được cung cấp ở đây cụ thể là hữu ích để ngăn ngừa sự tạo thành khối u, triệt các khối u và ức chế tăng trưởng khối u hoặc di căn. Các kháng thể kháng FAP được cung cấp ở đây có thể được sử dụng để xử lý khối u biểu hiện FAP bất kỳ. Các khối u ác tính cụ thể có thể được xử lý bằng các kháng thể kháng FAP được cung cấp ở đây bao gồm, ví dụ, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư da, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bào dục, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư não, bệnh ung thư cơ xương.

Các kháng thể kháng FAP được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng để ức chế tăng trưởng khối u hoặc giết chết các tế bào khối u. Ví dụ, các kháng thể kháng FAP có thể gắn kết với FAP có trên màng hoặc bề mặt tế bào của các tế bào ung thư (các tế bào khối u hoặc các tế bào của đệm khối u) và gây ra, ví dụ, ADCC hoặc phản ứng qua trung gian khác giết chết các tế bào ung thư.

Các kháng thể kháng FAP cũng có thể được sử dụng để chặn chức năng của FAP, cụ thể là bằng việc gây nhiễu bề ngoài sự gắn kết của hợp chất khác của nó. Ví dụ, các phân tử gắn kết kháng nguyên có thể được sử dụng để chặn độ hoạt động enzym của FAP (ví dụ, độ hoạt động serin peptidaza, gelatinaza, collagenaza), sự thoái hóa ECM FAP qua trung gian, và/hoặc sự lan rộng hoặc sự di cư tế bào FAP qua trung gian.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng FAP để sử dụng như một dược phẩm được cung cấp. Theo các khía cạnh khác, kháng thể kháng FAP để sử dụng trong điều trị bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP được cung cấp. Theo các phương án bất kỳ, kháng thể kháng FAP để sử dụng trong phương pháp điều trị được cung cấp. Theo các phương án bất kỳ, sáng chế cung cấp kháng thể kháng FAP để sử dụng trong phương pháp điều trị cho một cá thể có bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP, bao gồm việc cung cấp cho cá thể một lượng hữu hiệu kháng thể kháng FAP. Theo phương án này, phương pháp còn bao gồm việc cung cấp cho cá thể một lượng hữu hiệu của ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung, ví dụ, như được mô tả dưới đây. Theo các phương án khác nữa, sáng chế cung cấp kháng thể kháng FAP sử dụng để gây ra sự suy giảm của một tế bào. Theo các phương án bất kỳ, sáng chế cung cấp kháng thể kháng FAP để sử dụng trong phương pháp gây ra sự suy giảm của một tế bào ở một cá thể bao gồm việc cung cấp cho cá thể một lượng hữu hiệu kháng thể kháng FAP để gây ra sự suy giảm của tế bào. Một “cá thể” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là người. “Bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là bệnh ung thư, tốt nhất là bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư da, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bầu dục, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư não, bệnh ung thư cơ xương. “Tế bào” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là tế bào có mặt trong một khối u, như tế bào khối u hoặc tế bào của đệm khối u, tốt nhất là tế bào khối u. “biểu hiện FAP” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là

là biểu hiện bất thường, như biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện trong một mẫu khác nhau trong tế bào, so với mô bình thường của cùng loại tế bào.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế cung cấp việc sử dụng kháng thể kháng FAP để sản xuất hoặc điều chế dược phẩm. Theo một phương án, dược phẩm để điều trị bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP. Theo một phương án nữa, dược phẩm sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP bao gồm việc cung cấp cho một cá thể có bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP một lượng hữu hiệu dược phẩm. Theo phương án này, phương pháp còn bao gồm việc cung cấp cho cá thể một lượng hữu hiệu của ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung, ví dụ, như được mô tả dưới đây. Theo một phương án nữa, dược phẩm để gây ra sự suy giảm của một tế bào. Theo một phương án nữa, dược phẩm sử dụng trong phương pháp gây ra sự suy giảm của tế bào ở một cá thể bao gồm việc cung cấp cho cá thể một lượng hữu hiệu dược phẩm để gây ra sự suy giảm của tế bào. “Cá thể” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là người. “Bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là bệnh ung thư, tốt nhất là bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư da, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bầu dục, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư não, bệnh ung thư cơ xương. “Tế bào” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là a tế bào có mặt trong một khối u, như tế bào khối u hoặc tế bào của đệm khối u, tốt nhất là tế bào khối u. “Biểu hiện FAP” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là là biểu hiện bất thường, như biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện trong một mẫu khác nhau trong tế bào, so với mô bình thường của cùng loại tế bào.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế cung cấp phương pháp điều trị bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP. Theo một phương án, phương pháp bao gồm việc cung cấp cho một cá thể có bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP này một lượng hữu hiệu kháng thể kháng FAP. Theo phương án này, phương pháp còn

bao gồm việc cung cấp cho cá thể một lượng hữu hiệu của ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung, như được mô tả dưới đây. Theo một phương án nữa, sáng chế cung cấp phương pháp gây ra sự suy giảm của tế bào ở một cá thể. Theo một phương án, phương pháp bao gồm việc cung cấp cho cá thể một lượng hữu hiệu kháng thể kháng FAP để gây ra sự suy giảm của tế bào. “Cá thể” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là người. “Bệnh đặc trưng bởi biểu hiện của FAP” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là bệnh ung thư, tốt nhất là bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư da, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bầu dục, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư não, bệnh ung thư cơ xương. “Tế bào” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là tế bào có mặt trong một khối u, như tế bào khối u hoặc tế bào của đệm khối u, tốt nhất là tế bào khối u. “Biểu hiện FAP” theo các phương án bất kỳ nêu trên tốt hơn là là biểu hiện bất thường, như biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện trong một mẫu khác nhau trong tế bào, so với mô bình thường của cùng loại tế bào.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế cung cấp các công thức được bao gồm các kháng thể kháng FAP bất kỳ được cung cấp ở đây, ví dụ, để sử dụng trong các phương pháp điều trị bất kỳ nêu trên. Theo một phương án, công thức được bao gồm các kháng thể kháng FAP bất kỳ được cung cấp ở đây và một hoặc nhiều chất mang được dùng. Theo một phương án khác, công thức được bao gồm các kháng thể kháng FAP bất kỳ được cung cấp ở đây và ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng hoặc riêng rẽ hoặc kết hợp với các tác nhân khác để điều trị. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được đồng cung cấp với ít nhất một tác nhân điều trị bổ sung. Theo các phương án bất kỳ, tác nhân điều trị bổ sung là tác nhân kháng bệnh ung thư, ví dụ, tác

nhân hóa trị liệu, chất ức chế về sự tăng sinh tế bào khối u, hoặc chất hoạt hóa của gây chết tế bào tế bào khối u.

Các điều trị kết hợp này đã nêu trên bao gồm việc cung cấp kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều tác nhân điều trị được bao gồm trong cùng công thức hoặc cung cấp riêng biệt), và cung cấp riêng biệt, trong đó trường hợp, việc cung cấp kháng thể theo sáng chế có thể xảy ra trước khi, đồng thời, và/hoặc tiếp sau, việc cung cấp tác nhân điều trị bổ sung và/hoặc tác dược. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với bức xạ điều trị.

Kháng thể theo sáng chế (và tác nhân điều trị bổ sung bất kỳ) có thể được cung cấp bằng phương pháp bất kỳ phù hợp, bao gồm cả ngoài ruột, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn để điều trị cục bộ, cung cấp intralesional. Cung cấp ngoài ruột bao gồm trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong bụng, hoặc cung cấp dưới da. Cung cấp trong tĩnh mạch là tuyến cung cấp điển hình được ưa thích. Tuy nhiên, tuyến trong bụng được mong đợi là đặc biệt hữu ích, ví dụ, trong việc điều trị các khối u đại trực tràng. Liều lượng có thể theo tuyến bất kỳ phù hợp, ví dụ, bằng cách tiêm, như trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, phụ thuộc từng phần vào dù việc cung cấp là ngắn hay thường xuyên. Lịch trình liều lượng khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liều cung cấp đơn hay đa liều trên các thời điểm khác nhau, cung cấp dạng viên thuốc tọ, và truyền mạch được dự tính ở đây.

Các kháng thể theo sáng chế được tạo thành công thức, được tạo liều, và được cung cấp ở kiểu phù hợp với thực tiễn được phù hợp. Các nhân tố được xem xét trong nội dung này bao gồm rối loạn cụ thể được xử lý, động vật có vú cụ thể được xử lý, trạng thái lâm sàng của cá thể bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối của tác nhân, phương pháp cung cấp, lịch trình cung cấp, và các nhân tố khác đã biết với những người đang hành nghề được. Kháng thể không cần phải, nhưng tùy ý được tạo công thức với một hoặc nhiều các tác nhân hiện tại được sử dụng để ngăn ngừa hoặc xử lý rối loạn nghi ngờ. Lượng

hữu hiệu của các tác nhân khác này phụ thuộc vào lượng của kháng thể hiện tại trong công thức, loại rối loạn hoặc điều trị, và các nhân tố khác đã thảo luận ở trên. Chúng nói chung được sử dụng theo cùng các liều và với các tuyến cung cấp như được mô tả ở đây, hoặc khoảng từ 1 đến 99% các liều được mô tả ở đây, hoặc theo liều bất kỳ và bằng tuyến bất kỳ được xác định theo kinh nghiệm/về mặt lâm sàng để trở nên thích hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều thích hợp của kháng thể theo sáng chế (khi được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân điều trị bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần được điều trị, loại kháng thể, mức độ nghiêm trọng và diễn biến của bệnh, dù kháng thể được cung cấp cho các mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị, điều trị ưu tiên, lịch sử lâm sàng của bệnh nhân và sự đáp ứng với kháng thể, và sự quyết định của bác sỹ điều trị. Kháng thể được cung cấp phù hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc toàn bộ các đợt điều trị. Phụ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 15 mg/kg (ví dụ, 0,1 mg/kg -10 mg/kg) kháng thể có thể là liều tiêu biểu đại diện ban đầu để cung cấp cho bệnh nhân, do, ví dụ, bằng một hoặc nhiều tuyến cung cấp riêng biệt, hoặc bằng cách truyền liên tục. Liều hàng ngày điển hình có thể nằm trong phạm vi từ khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các nhân tố nêu trên. Đối với các cung cấp liên tiếp qua vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng, sự điều trị nói chung sẽ được duy trì cho đến khi tiến hành triệt tiêu các triệu chứng bệnh mong muốn. Một liều kháng thể làm ví dụ sẽ nằm trong phạm vi từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg . Nhờ đó, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng) có thể được cung cấp cho bệnh nhân. Các liều này có thể được cung cấp không liên tục, ví dụ, hằng tuần hoặc hằng ba tuần (ví dụ, để bệnh nhân này tiếp nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Một liều nạp cao hơn ban đầu, tiếp theo bằng một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được cung cấp. Tuy nhiên, các chế độ liều

khác có thể hữu ích. Sự tiến triển của quá trình điều trị này được giám sát dễ dàng bằng các kỹ thuật và các thử nghiệm thông thường.

Điều này được hiểu rằng các phương pháp tạo công thức hoặc điều trị bất kỳ có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể tiếp hợp của sáng chế thay vì hoặc ngoài ra với kháng thể kháng FAP.

H. Các vật liệu sản xuất

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, vật liệu sản xuất có chứa các vật liệu hữu dụng để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán về các rối loạn được mô được cung cấp ở trên. Vật liệu sản xuất bao gồm một vật chứa và một nhãn hoặc gói chèn để kết hợp với vật chứa. Các vật chứa phù hợp bao gồm, ví dụ, các chai, lọ, ống, các túi dung dịch IV, v.v.. Các vật chứa có thể được tạo thành từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa giữ chế phẩm trong đó bởi chính nó hoặc được kết hợp với chế phẩm khác hiệu quả để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng và có thể có cổng đầu vào vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là một dung dịch túi hoặc lọ trong tĩnh mạch có một nút xuyên qua bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một tác nhân hoạt tính trong chế phẩm là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc gói chèn cho thấy rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng chọn lựa. Hơn nữa, vật liệu sản xuất có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất với một chế phẩm được chứa ở đây, trong đó chế phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai với một chế phẩm được chứa ở đây, trong đó chế phẩm còn bao gồm một tác nhân điều trị khác hoặc gây độc. Vật liệu sản xuất theo phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm một gói chèn chỉ ra rằng các chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị tình trạng cụ thể. Ngoài ra, hoặc hơn nữa, vật liệu sản xuất có thể còn bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm một bộ đệm được dụng, như nước kim hãm vi khuẩn để tiêm (BWFI), muối được đệm photphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các vật liệu khác thích hợp từ thị trường và

người sử dụng, bao gồm cả các bộ đệm khác, các chất pha loãng, các dụng cụ lọc, các cây kim, và các ống.

Cần hiểu rằng các vật liệu bất kỳ nêu trên của quy trình sản xuất có thể bao gồm kháng thể tiếp hợp theo sáng chế thay thế hoặc ngoài ra với kháng thể kháng FAP.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ về các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế được mô tả dưới đây. Cần hiểu rằng các phương án khác nhau khác có thể được thực hiện theo phần mô tả chung được cung cấp trên đây.

Ví dụ 1

Các kỹ thuật tái tổ hợp ADN

Các phương pháp tiêu chuẩn được sử dụng để điều khiển ADN như được mô tả trong Sambrook, J. et al., *Phân tử vô tính: A laboratory manual*; Lạnh Spring Harbor Laboratory Press, Lạnh Spring Harbor, New York, 1989. Phản ứng sinh học phân tử được sử dụng theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các trình tự ADN được xác định bằng trình tự sợi kép. Trong một số trường hợp, các đoạn gen mong muốn được điều chế bằng Geneart AG (Regensburg, Germany) từ các oligonucleotit tổng hợp và các sản phẩm PCR bởi sự tổng hợp gen tự động. Các đoạn gen trong đó được đi vòng bởi các vị trí phân tách endonucleaza hạn chế nổi bật được vô tính trong các plasmid pGA18 (ampR). ADN plasmid được tinh chế từ vi khuẩn biến đổi và nồng độ được xác định bằng quang phổ học UV. Trình tự ADN của các đoạn gen vô tính phụ được xác nhận bằng trình tự ADN. Các đoạn gen được thiết kế với các vị trí hạn chế phù hợp để cho phép vô tính phụ trong các vectơ biểu hiện tương ứng.

Thông tin chung đề cập đến các trình tự nucleotit của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch người được đưa ra trong: Kabat, E.A. et al., (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest*, Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242. Để biểu hiện, tất cả các cấu trúc có chứa trình tự ADN đầu 5' mã hóa

cho peptit dẫn đầu trong đó các protein đích để tiết trong các tế bào nhân thực. Các SEQ ID NO: 323-331 đưa ra các peptit dẫn đầu làm ví dụ và các trình tự polynucleotit mã hóa chúng.

Sự điều chế các kháng thể (được xử lý bằng glycogen)

Toàn bộ các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể đã thu được bằng cách nhân dòng phụ các vùng biến đổi trong cấu trúc với hoặc lượng chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được chèn vào trước trong vector biểu hiện động vật có vú tiếp nhận tương ứng. Kháng thể biểu hiện được kích thích bằng chất hoạt hóa MPSV và vector mang trình tự tín hiệu polyA tổng hợp ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra mỗi vector có chứa một trình tự EBV OriP.

Các kháng thể được tạo ra bằng các tế bào HEK293-EBNA đồng truyền nhiễm với các vector biểu hiện kháng thể động vật có vú bằng cách sử dụng photphat-chuyển nhiễm canxi. Sự phát triển theo cấp số nhân các tế bào HEK293-EBNA được chuyển nạp bằng phương pháp photphat canxi. Ngoài ra, các tế bào HEK293 phát triển trong huyền phù được chuyển nạp bằng polyetylenimin. Đối với quá trình sản xuất của kháng thể chưa biến đổi không được xử lý bằng glycogen, các tế bào chỉ được chuyển nạp với các vector biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể ở tỷ lệ 1:1.

Để sản xuất kháng thể được xử lý bằng glycogen, các tế bào được đồng chuyển nạp với hai plasmit bổ sung, một cho polypeptit biểu hiện GnTIII hợp nhất (vector biểu hiện GnT-III), và một cho biểu hiện manosidaza II (vector biểu hiện Golgi manosidaza II) ở tỷ lệ 4:4:1:1 tương ứng. Các tế bào được phát triển như lớp đơn dính nuôi cấy trong bình T bằng cách sử dụng môi trường nuôi DMEM được bổ sung 10% FCS, và được chuyển nạp khi chúng gặp nhau ở giữa 50 và 80%. Để chuyển nhiễm bình T150, 15 triệu tế bào được gieo 24 giờ trước khi chuyển nhiễm trong 25 ml môi trường nuôi DMEM được bổ sung FCS (ở 10% V/V cuối cùng), và các tế bào được đặt ở 37°C trong một lồng ấp với 5% CO₂ khí qua đêm. Đối với mỗi bình T150 cần được chuyển nạp, dung dịch của

ADN, CaCl_2 và nước được điều chế bằng cách trộn 94 μg tổng vector ADN plasmit được chia đều giữa các vector biểu hiện chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, nước cho thể tích cuối cùng 469 μl và 469 μl của 1M dung dịch CaCl_2 . Cho dung dịch này, 938 μl của 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM dung dịch Na_2HPO_4 ở pH 7,05 được bổ sung, được trộn tức thì trong 10 giây và lấy lên để giữ ở nhiệt độ phòng trong 20 giây. Huyền phù được pha loãng với 10 ml của DMEM được bổ sung 2% FCS, và được bổ sung cho T150 thay thế cho môi trường hiện tại. Sau đó, 13 ml của môi trường chuyển nhiễm bổ sung được bổ sung. Các tế bào được nuôi cấy ở 37°C , 5% CO_2 trong khoảng 17 đến 20 giờ, sau đó môi trường được thay thế bằng 25 ml DMEM, 10% FCS. Môi trường nuôi có điều kiện được thu hoạch xấp xỉ 7 ngày trao đổi môi trường trước bằng cách ly tâm trong 15 phút ở $210 \times g$, dung dịch được lọc vô trùng (bộ lọc 0,22 μm) và natri azit ở nồng độ cuối cùng 0,01 % w/v được bổ sung, và được giữ 4°C .

Kiểu đại được tiết ra hoặc các kháng thể afucosyl được xử lý bằng glycogen được tinh chế từ các tế bào nuôi cấy nổi bằng ái lực sắc ký bằng cách sử dụng ái lực sắc ký Protein A (HiTrap ProtA, GE Healthcare). Trong một thời gian ngắn, cột được làm cân bằng với 20 mM natri photphat, 20 mM natri citrat pH 7,5, tế bào nổi được nạp, tiếp theo rửa lần thứ nhất với 20 mM natri photphat, 20 mM natri citrat pH 7,5, và rửa lần thứ hai với 13,3 mM natri photphat, 20 mM natri citrat, 500 mM natri clorua pH 5,45. Các kháng thể được tách rửa bằng 20 mM natri citrat, 100 mM natri clorua, 100 mM glyxin pH 3. Trong bước sắc ký loại trừ sau kích cỡ trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) bộ đệm được trao đổi đến 25 mM kali photphat, 125 mM natri clorua, 100 mM dung dịch glyxin pH 6,7 hoặc luân phiên 140 mM natri clorua, 20 mM ixtidin, pH 6,0 và các kháng thể IgG1 monome tinh khiết được gom. Nếu cần, bước sắc ký trao đổi cation bổ sung được bao gồm giữa hai bước thanh lọc tiêu chuẩn.

Nồng độ protein của các mẫu protein được tinh chế được xác định bằng cách đo mật độ quang học (OD) ở 280 nm, bằng cách sử dụng hệ số giảm mật độ quang theo số mol được tính dựa vào trình tự axit amin. Trọng lượng nguyên chất và phân tử của các kháng thể được phân tích bằng SDS-PAGE với sự có mặt và vắng mặt của tác nhân khử (5 mM 1,4-dithiotreitol) và được đổi màu với Coomassie (SimpleBlue™ SafeStain từ Invitrogen). hệ thống gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen, USA) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất (4-20% các gel Tris-Glyxin hoặc 3-12% Bis-Tris). Thành phần kết hợp của kháng thể mẫu được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ kích cỡ Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare, Thụy Điển) trong bộ đệm di động 2 mM MOPS, 150 mM NaCl, 0,02% NaN₃, pH 7,3 ở 25°C. Tính nguyên vẹn của khung axit amin trong số các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng kháng thể đã khử được xác định bằng phổ khối NanoElectrospray Q-TOF sau khi loại bỏ các polysaccharit N- bằng điều trị enzym với glycosidaza F peptit-N (Roche Molecular Biochemicals).

Kết quả của sự thanh lọc và sự phân tích của kiểu đại và được xử lý bằng glycogen các kháng thể IgG người 28H1, 29B11, 3F2 và 4G8 được thể hiện trong các Fig. 15 đến 22. Hiệu suất được đưa ra trong bảng sau:

	Hiệu suất (mg/L)	
	kiểu đại	được xử lý bằng glycogen
28H1 hu IgG	46	40
29B11 hu IgG	10	14
3F2 hu IgG	144	7
4G8 hu IgG	55	12,6

Các oligosacarit được gắn kèm với vùng Fc của các kháng thể được phân tích bằng MALDI TOF-MS như được mô tả dưới đây. Các oligosacarit được giải phóng như enzym từ các kháng thể bằng khả năng phân cắt PNGaseF. Dung dịch phân loại tạo thành có chứa các oligosacarit được giải phóng hoặc được

điều chế trực tiếp cho sự phân tích MALDI TOF-MS hoặc còn được phân loại bằng EndoH Glycosidaza trước khi sự điều chế mẫu cho sự phân tích MALDI TOF-MS.

Phân tích về cấu trúc glyco của (được xử lý bằng glycogen) các kháng thể

Để xác định các tỷ lệ liên quan của oligosacarit có chứa cấu trúc fucoza- và non-fucoza (a-fucoza), các polysacarit được giải phóng của vật liệu kháng thể đã tinh chế được phân tích bằng phổ khối MALDI-Tof. Mẫu kháng thể (khoảng 50 µg) được nuôi cấy qua đêm ở 37°C với 5 mU N-Glycosidaza F (QAbio; PNGaseF: E-PNG01) trong 2 mM Tris, pH 7,0, để giải phóng oligosacarit từ khung protein. Để khử nhóm NH₂ ra khỏi các hợp chất hữu cơ của các axit axetic polysacarit đến nồng độ cuối cùng 150 mM được bổ sung và được nuôi cấy trong 1 giờ ở 37°C. Để phân tích bằng phổ khối MALDI TOF, 2 µL mẫu được trộn trên đích MALDI với 2 µL dung dịch thể mẹ DHB (axit 2,5-dihydroxybenzoic (Bruker Daltonics #201346) được hòa tan trong 50% etanol/5 mM NaCl ở 4 mg/ml) và được phân tích bằng dụng cụ Autoflex II phổ khối MALDI TOF (Bruker Daltonics). Thông thường, 50-300 ảnh chụp được ghi lại và được tổng kết cho một thử nghiệm riêng. Quang phổ đã thu được được đánh giá bằng phần mềm phân tích cong (Bruker Daltonics) và các khối được xác định cho mỗi trong số các đầu được phát hiện. Sau đó, các đầu được chỉ định cho fucoza hoặc-fucoza (không fucoza) có chứa các cấu trúc cacbohydrat bằng sự so sánh các khối được tính và các khối được mong muốn đối với các cấu trúc tương ứng về lý thuyết (ví dụ, phức hợp, lai và oligo- hoặc mannoza cao tương ứng, có và không có fucoza).

Để xác định về tỷ lệ các cấu trúc lai, các mẫu kháng thể được phân loại bằng N-Glycosidaza F và Endo-Glycosidaza H đồng thời (QAbio; EndoH: E-EH02). N-Glycosidaza F giải phóng toàn bộ các cấu trúc polysacarit liên kết N (các cấu trúc phức hợp, lai và oligo- và high mannoza) từ khung protein và Endo-Glycosidaza H cắt toàn bộ các polysacarit kiểu lai bổ sung giữa hai gốc N-

axetylglucosamin (GlcNAc) ở đầu khử của polysacarit. Sau đó, các đoạn cắt này được xử lý và được phân tích bằng phổ khối MALDI TOF theo cùng cách như được mô tả ở trên để N-Glycosidaza F được phân loại mẫu. Bằng sự so sánh mẫu từ phân loại N-Glycosidaza F và phân loại N-Glycosidaza F/Endo H kết hợp, độ giảm của các tín hiệu của cấu trúc cacbohydrat cụ thể được sử dụng để đánh giá thành phần có liên quan của các cấu trúc lai. Lượng liên quan của mỗi cấu trúc cacbohydrat được tính từ tỷ lệ của pic của một cấu trúc cá thể và tổng các pic của toàn bộ các oligosacarit được phát hiện. Lượng fucoza là tỷ lệ phần trăm của các cấu trúc có chứa fucoza có liên quan đến tất cả các cấu trúc cacbohydrat được xác định trong mẫu được xử lý bằng N-Glycosidaza F (ví dụ, các cấu trúc phức hợp, lai và oligo- và mannoza cao tương ứng). Lượng không fucosyl hóa là tỷ lệ phần trăm của các cấu trúc không có fucoza - có liên quan đến tất cả các cacbohydrat được xác định trong mẫu được xử lý N-Glycosidaza F (ví dụ, các cấu trúc phức hợp, lai và oligo- và mannoza cao tương ứng).

Các mức độ không fucosyl hóa của kiểu đại khác nhau và được xử lý bằng glycogen các kháng thể kháng FAP được đưa ra trong bảng sau:

Kháng thể	Không fucosyl hóa (%)	
	Kiểu đại	Được xử lý bằng glycogen
Hu IgG 28H1	10	40
Hu IgG 29B11	5	27
Hu IgG 3F2(YS)	2,4	64
Hu IgG 4G8	3,8	78

Ví dụ 2

Cấu trúc của các thư viện Fab cùng kiểu gen

Các thư viện kháng thể cùng kiểu gen trong dạng Fab được cấu trúc trên cơ sở các gen dòng mầm người bằng cách sử dụng các cặp ghép miền V sau: chuỗi nhẹ kapa Vk3_20 với chuỗi nặng VH3_23 đối với thư viện DP47-3 và chuỗi nhẹ

kapa Vkl_17 với chuỗi nặng VH1_69 đối với thư viện DP88-3. Xem SEQ ID NO: 1 và 2.

Cả hai thư viện được chọn ngẫu nhiên trong CDR3 của chuỗi nhẹ (L3) và CDR3 của chuỗi nặng (H3) và được tập hợp từ 3 đoạn bởi thư viện bằng cách ghép bằng cách nhân rộng chồng lấn (SOE) PCR. Đoạn 1 bao gồm đầu 5' của gen kháng thể bao gồm cả L3 ngẫu nhiên, đoạn 2 là hằng số trung tâm đoạn kéo dài từ L3 đến H3, trong khi đoạn 3 bao gồm H3 ngẫu nhiên và một phần 3' của gen kháng thể.

Sự kết hợp chất đệm được sử dụng để tạo ra thư viện các đoạn đối với thư viện DP47-3: đoạn 1 (LMB3 – LibL1b_new), đoạn 2 (MS63 – MS64), đoạn 3 (Lib2H - fdseqlong). Xem Bảng 3. Các đoạn mỗi kết hợp sau được sử dụng để tạo ra thư viện các đoạn đối với thư viện DP88-3: đoạn 1 (LMB3 – RJH_LIB3), đoạn 2 (RJH31 – RJH32) và đoạn 3 (LIB88_2 - fdseqlong). Xem Bảng 4.

Bảng 3

Các đoạn mỗi được sử dụng trong thư viện DP47-3		SEQ ID NO
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
LibL1b_new	CACTTTGGTCCCCTGGCCGAACGTMNNGGGMN NMNNMNNACCCTGCTGACAGTAATACACTGC	333
MS63	TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCC	334
MS64	ACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGG	335
Lib2H	GGCCGTATATTACTGTGCGAAANNKNNKNNKN NKNNKTTTGACTACTGGGGCCAAGGAAC	336
fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG	337

Bảng 4

Các đoạn mỗi được sử dụng trong thư viện DP88-3		SEQ ID NO
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
RJH_LIB3	GACTTTGGTGGCCTGGCCAAACGT MNN GGG MNN MNN ACC MNN	338

	CTGCAAGCAGTAATAGGTGGCAAAATC	
RJH31	ACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAG	339
RJH32	TCTCGCACAGTAATACACGGCGGTGTCC	340
LIB88_2	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA –[(33% GAC Asp; 26% GGT Gly; 10% GAA Glu; 9% CGT Arg; 7% Lys; 6% GTT Val; 5% TCT Ser; 4% CTG Leu)1 - (23% GGT Gly; 17% TAC Tyr; 16% TCT Ser; 11% GCT Ala; 9% CGT Arg; 7% AAC Asn; 6% ACT Thr; 6% GTT Val; 5% CCG Pro)8]- TTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACC GTCTCC	341
fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG	337

Tiến trình PCR để sản xuất của thư viện các đoạn bao gồm: 5 phút biến tính ban đầu ở 94°C; 25 chu kỳ 1 phút ở 94°C, 1 phút ở 58°C, và 1 phút ở 72°C; và kéo dài trong 10 phút ở 72 °C. Để tập hợp PCR, các tỷ lệ đẳng phân tử của 3 đoạn được sử dụng làm khuôn. Tiến trình thực hiện PCR lắp ghép bao gồm: 3 phút biến tính ban đầu ở 94°C; và 5 vòng 30 giây ở 94°C, 1 phút ở 58°C, và 2 phút ở 72°C. Ở giai đoạn này, các đoạn mới bổ sung cho các đoạn trình tự bên ngoài 1-3 được bổ sung và tiến hành 20 chu kỳ để kéo dài trong 10 phút ở 72 °C.

Sau khi tập hợp các lượng thích hợp của toàn bộ độ dài các cấu trúc Fab ngẫu nhiên, các cấu trúc Fab được phân loại bằng *NcoI/NotI* đối với thư viện DP47-3 và với *NcoI/NheI* để thư viện DP88-3 dọc theo vector phagemit chấp nhận được xử lý tương tự. Đối với thư viện DP47-3, 22,8 µg thư viện Fab được nối bằng 16,2 µg vector phagemit. Đối với thư viện DP88-3, 30,6 µg thư viện Fab được nối bằng 30,6 µg vector phagemit.

Các đoạn nối được tinh sạch sử dụng để chuyển nhiễm cho 68 sự biến đổi đối với thư viện DP47-3 và 64 sự biến đổi đối với thư viện DP88-3 tương ứng, để đạt được các kích cỡ thư viện cuối cùng của $4,2 \times 10^{10}$ đối với DP47-3 và $3,3 \times 10^9$ đối với DP88-3. Các phần tử phagemit biểu thị các thư viện Fab được thu hồi và được tinh sạch bằng cách lọc PEG/NaCl được sử dụng để chọn lọc.

Ví dụ 3

Chọn lọc dòng vô tính kháng FAP (các chọn lọc sơ cấp)

Các chọn lựa được tiến hành kháng miễn ngoài của protein kích hoạt nguyên bào sợi người hoặc chuột (FAP) trong đó được nhân dòng ngược chiều poly-lyzin và 6×his-tag. Xem SEQ ID NO: 317 và 319. Trước khi chọn lọc, các kháng nguyên được phủ trong các ống miễn dịch ở nồng độ hoặc 10 µg/ml hoặc 5 µg/ml, phụ thuộc vào vòng chọn lọc. Các chọn lọc được tiến hành theo giao thức sau: (i) gắn kết của $\sim 10^{12}$ phần tử phagemit của thư viện DP47-3 với FAP người hoặc chuột được giữ cố định trong 2 giờ; (ii) rửa sạch các ống miễn dịch bằng cách sử dụng $5 \times 5\text{mL}$ PBS/Tween20 và $5 \times 5\text{mL}$ PBS; (iii) tách rửa các phần tử thể thực khuẩn bằng việc bổ sung 1mL 100mM TEA (triethylamine) trong 10 phút và trung hòa bằng việc bổ sung 500 µL 1M Tris/HCl pH 7,4; và (iv) tiêm nhiễm lại các tế bào *E. coli* TG1 pha log, tiêm nhiễm với thể thực khuẩn trợ giúp VCSM13 và sau sự kết tủa PEG/NaCl của các phần tử phagemit để được sử dụng trong các vòng chọn lọc sau.

Các chọn lựa đã được tiến hành hơn ba hoặc bốn vòng bằng cách sử dụng các nồng độ kháng nguyên giảm của FAP người và trong một số trường hợp bằng cách sử dụng FAP chuột ở 5 µg/ml trong vòng chọn lọc cuối cùng. Các chất gắn kết đặc hiệu được xác định như các tín hiệu $5 \times$ cao hơn nền và được xác định bằng ELISA. Các tấm maxisorp NUNC được phủ bằng 10 µg/ml của FAP người hoặc chuột tiếp theo bằng việc bổ sung các thể nổi vi khuẩn có chứa Fab và phát hiện về các Fab gắn kết đặc hiệu nhờ các đích Flag của chúng bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng Flag/HRP.

Các dòng dương ELISA được biểu hiện do vi khuẩn như 1 mL nuôi cấy ở dạng 96 giếng và các thể nổi được cho qua thử nghiệm quét động lực học bằng cách sử dụng BIACORE T100. K_D được đo bằng sự cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở 25°C với kháng thể gắn kết đặc hiệu đoạn F(ab')₂ kháng người (Jackson

ImmunoResearch #109-005-006) được giữ cố định bằng việc ghép amin trên các mạch CM5 và sau thu giữ của các Fabs từ thể nổi vi khuẩn hoặc từ việc điều chế Fab được tinh sạch. Trong một thời gian ngắn, các mạch cảm biến sinh học dextran được carboxymethylat (CM5, GE Healthcare) được kích hoạt bằng N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-cacbodiimit hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuxinimit (NHS) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Kháng thể gắn kết đặc hiệu đoạn F(ab')₂ kháng người được pha loãng bằng 10 mM natri axetat, pH 5,0 ở 50 µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ dòng chảy 10 µl/phút để đạt được gần lên đến 10,000 đơn vị phản ứng (RU) của kháng thể thu giữ được ghép cặp. Tiếp theo việc tiêm kháng thể thu giữ, 1 M etanolamin được tiêm để chặn các nhóm không phản ứng. Để đo động lực học, các Fabs từ thể nổi vi khuẩn hoặc các Fab được tinh chế được tiêm ở tốc độ dòng chảy 10 µl/phút trong 300 giây và phân ly trong 300 giây để thu giữ sự ổn định đường chuẩn. Các mức độ thu giữ nằm trong phạm vi 100 đến 500 RU. Trong bước sau, phép phân tích FAP người hoặc chuột được tiêm hoặc như nồng độ đơn hoặc như các chuỗi nồng độ (phụ thuộc vào ái lực vô tính trong phạm vi giữa 100 nM và 250 pM) được pha loãng trong HBS-EP+ (GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất có hoạt tính bề mặt P20, pH 7,4) ở 25°C ở tốc độ dòng chảy 50 µl/phút. Thời gian kết hợp là 120 hoặc 180 giây, thời gian phân ly là 300 đến 600 giây. Bề mặt của mạch cảm ứng được phục hồi bằng cách tiêm glyxin pH 1,5 trong 30 giây ở 90 µl/phút tiếp theo bằng cách tiêm NaOH trong 20 giây ở cùng tốc độ dòng chảy. Các tốc độ kết hợp (k_{on}) và các tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một-đến-một đơn giản (Phần mềm đánh giá BIACORE ® T100 hoặc phần mềm Scrubber (BioLogic)) bằng việc điều chỉnh đồng thời các sensorgram kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính theo tỷ lệ k_{off}/k_{on} .

Ví dụ 4

Cấu trúc của các thư viện sự hoàn thiện ái lực kháng FAP

Ba thư viện hoàn thiện ái lực được cấu trúc dựa vào các kháng thể được chọn trước từ các chọn lựa kháng FAP sơ cấp. Đặc biệt hơn, chúng dựa vào (i) vô tính 2D9 kháng FAP người (thư viện a.m.FAP2D9) (xem SEQ ID NO: 229 và 231), (ii) vô tính 4B8 kháng FAP chuột (thư viện a.m.FAP4B8) (xem SEQ ID NO: 233 và 235) và (iii) các vô tính phản ứng ngang 7A1, 13B2, 13C2, 13E8, 14C10 và 17A11 (thư viện a.m.FAPpool) (xem SEQ ID NO: 237 và 239 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 7A1; SEQ ID NO: 241 và 243 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 13C2; SEQ ID NO: 245 và 247 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 13E8; SEQ ID NO: 249 và 251 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 14C10; và SEQ ID NO: 253 và 255 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 17A11).

Mỗi thư viện này bao gồm hai thư viện phụ, được chọn ngẫu nhiên trong hoặc CDR1 và CDR2 của chuỗi nhẹ (L1/L2) hoặc CDR1 và CDR2 của chuỗi nặng (H1/H2) tương ứng. Các thư viện phụ này được chia phần nhờ sự biến đổi. Mỗi thư viện phụ này được cấu trúc bằng bốn bước sau của sự khuếch đại và tập hợp.

Đối với các thư viện L1/L2, giao thức khuếch đại và tập hợp bao gồm: (i) sự khuếch đại của đoạn 1 (LMB3 – DPK22_CDR1_rand_ba_opt) và đoạn 2 (DPK22_CDR1_fo – DPK22_Ck_BsiWI_ba); (ii) tập hợp của các đoạn 1 và 2 bằng cách sử dụng các đoạn môi bên ngoài LMB3 và DPK22_Ck_BsiWI_ba để tạo khuôn cho đoạn 3; (iii) sự khuếch đại của đoạn 3 (LMB3 – DPK22_CDR2_rand_ba) và đoạn 4 (DPK22_CDR2_fo – DPK22_Ck_BsiWI_ba); và (iv) tập hợp cuối cùng của các đoạn 3 và 4 bằng cách sử dụng cùng các đoạn môi bên ngoài như trên. Xem Bảng 5 cho các trình tự đoạn môi.

Bảng 5

Các đoạn môi được sử dụng trong các thư viện sự hoàn thiện ái lực L1/L2 đối với sự hoàn thiện ái lực kháng FAP		SEQ ID NO
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	332
DPK22_CDR1_rand_ba_opt	CAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAAGT <u>AGCTGCTGCT</u> AACACTCTGACTGGCCC TGCAAG	342
DPK22_CDR1_fo	TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG	343.
DPK22_Ck_BsiWI_ba	GGTGCAGCCACCGTACGTTTGATTTC	344
DPK22_CDR2_rand_ba	CTGTCTGGGATGCCAGTGGCCCTGCTG <u>GAGGCGCCATAG</u> ATGAGGAGCCTGGG AGCCTG	345
DPK22_CDR2_fo	AGGGCCACTGGCATCCCAGACAG	346

In đậm: 60% bazơ gốc và 40% ngẫu nhiên như M

Gạch dưới: 60% bazơ gốc và 40% ngẫu nhiên như N

Đối với các thư viện H1/H2, sự khuếch đại và giao thức tập hợp bao gồm:

(i) sự khuếch đại của đoạn 1 (RJH53 – DP47_CDR1_rand_ba_opt) và đoạn 2 (DP47_CDR1_fo – MS52); (ii) tập hợp của các đoạn 1 và 2 bằng cách sử dụng các đoạn môi vòng ngoài RJH53 và MS52 để tạo khuôn cho đoạn 3; (iii) sự khuếch đại của đoạn 3 (RJH53 – DP47_CDR2_rand_ba) và đoạn 4 (DP47_CDR2_fo – MS52); và (iv) cuối cùng tập hợp của các đoạn 3 và 4 bằng cách sử dụng cùng các đoạn môi vòng ngoài như trên. Xem Bảng 6 cho các trình tự đoạn môi.

Bảng 6.

Các đoạn môi được sử dụng trong các thư viện sự hoàn thiện ái lực H1/H2 đối với sự hoàn thiện ái lực kháng FAP		SEQ ID NO
RJH53	CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC	347
DP47_CDR1_rand	GAGCCTGGCGGACCCAGCTCATGGCA	348

_ba_opt	<u>TAACTGCTAAAGGTGAATCCGGAGGC</u>	
DP47_CDR1_fo	ATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTC	349
MS52	GAAGACCGATGGGCCTTTGGTGCTAG	350
DP47_CDR2_rand _ba	CCTTCACGGAGTCTGCGTAGTATGTGC <u>TACCACCACTACCACTAATAGCTGAGA</u> CCCACTCCAGCCCCCTTCCC	351
DP47_CDR2_fo	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG	352

In đậm: 60% bazơ gốc và 40% sự ngẫu nhiên như M

Gạch dưới: 60% bazơ gốc và 40% sự ngẫu nhiên như N

Các sản phẩm tập hợp cuối cùng đã được phân loại với *NcoI/BsiWI* đối với các thư viện phụ L1/L2 của a.m.FAP2D9 và a.m.FAP4B8, với *MunI* và *NheI* đối với các thư viện phụ H1/H2 của a.m.FAP2D9 và a.m.FAP4B8 cũng như với *NcoI/BamHI* đối với thư viện L1/L2 của a.m.FAPpool và với *BspEI/PstI* đối với các thư viện H1/H2 của a.m.FAPpool tương ứng, dọc theo các vector chấp nhận được xử lý tương tự dựa vào sự điều chế plasmit của các dòng vô tính 2D9, 4B8 hoặc hỗn hợp đẳng phân tử của các dòng vô tính 7A1, 13B2, 13C2, 13E8, 14C10 và 17A11 tương ứng. Các lượng sau của các miền V ngẫu nhiên được phân loại (từng phần) và các vector chấp nhận được phân loại được thắt chặt với các thư viện tương ứng (μg miền V/ μg vector): thư viện phụ a.m.FAP2D9 L1/L2 (5,7/21,5), thư viện phụ a.m.FAP2D9 H1/H2 (4,1/15,5), thư viện phụ a.m.FAP4B8 L1/L2 (6,5/24,5), thư viện phụ a.m.FAP4B8 H1/H2 (5,7/21,5), thư viện phụ a.m.FAPpool L1/L2 (4,4/20), thư viện phụ a.m.FAPpool H1/H2 (3,4/15,5).

Các phối tử được tinh chế của các thư viện phụ L1/L2 và H1/H2 được chia phần và được sử dụng cho 60 sự biến đổi cho mỗi trong số 3 thư viện hoàn thiện ái lực, để đạt được các kích cỡ thư viện cuối cùng của $6,2 \times 10^9$ cho a.m.FAP2D9, $9,9 \times 10^9$ cho a.m.FAP4B8 và $2,2 \times 10^9$ cho a.m.FAPpool.

Các phần tử phagemit biểu thị các thư viện Fab này được thu hồi và được tinh chế bằng sự thanh lọc PEG/NaCl để được sử dụng cho các chọn lọc thứ hai.

Cấu trúc của các thư viện sự hoàn thiện ái lực kháng FAP bổ sung (dựa vào các dòng vô tính 3F2, 3D9, 4G8, 4B3 và 2C6)

Bốn thư viện hoàn thiện ái lực bổ sung được cấu trúc trên cơ sở các kháng thể phản ứng ngang được chọn trước từ vận động hoàn thiện ái lực thứ nhất của các kháng thể kháng FAP, cụ thể là các dòng vô tính 3F2, 3D9, 4G8, 4B3 và 2C6 (xem SEQ ID NO: 195 và 197 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 3F2; SEQ ID NO: 199 và 201 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 3D9; SEQ ID NO: 205 và 207 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 4G8; SEQ ID NO: 209 và 211 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 4B3; SEQ ID NO: 217 và 219 tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của 2C6). Chính xác hơn, bốn thư viện được dựa vào 1) các dòng vô tính kháng FAP 3F2, 4G8 và 4B3 (thư viện V_H, được chọn ngẫu nhiên trong các CDR 1 và 2 của chuỗi nặng biến đổi, tức là, thư viện H1/H2), 2) các dòng vô tính kháng FAP 3D9 và 2C6 (thư viện V_L, được chọn ngẫu nhiên trong các CDR 1 và 2 của biến đổi chuỗi nhẹ, tức là, thư viện L1/L2), 3) dòng vô tính kháng FAP 3F2 (thư viện L3 sự ngẫu nhiên mềm trong CDR3 của chuỗi nhẹ, tức là, thư viện L3) và 4) dòng vô tính kháng FAP 3F2 (thư viện H3 với sự ngẫu nhiên mềm trong CDR3 của chuỗi nặng, tức là, thư viện H3). Hai thư viện thứ nhất được cấu trúc chính xác cùng cùng cách như được phác thảo đối với vận động hoàn thiện ái lực thứ nhất của các kháng thể kháng FAP, đối với các thư viện L1/L2 và H1/H2 tương ứng. Ngược lại, đối với các thư viện hoàn thiện ái lực L3 và H3 dựa vào dòng vô tính 3F2, hai đoạn mới mới được sử dụng để mở đầu sự ngẫu nhiên mềm trong L3 (AM_3F2_DPK22_L3_ba: CACTTTGGTCCCCTGGCCGAACGT CGGGGGAAGCA TAATACCCTGCTGACAGTAATACTGC với các phần được gạch dưới là 60% phần đưa ra và 40% hỗn hợp N (hỗn hợp của bốn nucleotit A, C, G, và T)) và H3 (AM_3F2_DP47_H3_fo: GGCCGTATATTACTGTGCG A4A GGG TGG TTT GGT GGT TTT AAC

TACTGGGGCCAAGGAAC với các phần được gạch dưới là 60% phần đưa ra và 40% hỗn hợp N, các phần in nghiêng là 60% phần đưa ra và 40% G, cũng như các phần được gạch dưới trong các phần in nghiêng là 60% phần đưa ra và 40% hỗn hợp K (hỗn hợp của hai nucleotit G và T)) của dòng vô tính mẹ. Các thư viện kích cỡ như sau: thư viện H1/H2 ($1,13 \times 10^{10}$), thư viện L1/L2 ($5,6 \times 10^9$), thư viện L3 ($2,3 \times 10^{10}$) và thư viện H3 ($2,64 \times 10^{10}$).

Ví dụ 5

Chọn lựa của các dòng vô tính kháng FAP ái lực hoàn thiện

Các chọn lựa được tiến hành kháng lại miền ngoài của protein kích hoạt nguyên bào sợi người hoặc chuột (FAP) trong đó được nhân dòng 5' của chuỗi lyzin và 6×his-tag. Xem SEQ ID NO: 317 và 319. Trước khi chọn lựa, các kháng nguyên được phủ trong các ống miễn dịch ở nồng độ hoặc là 10 µg/mL, 5 µg/mL hoặc 0,2 µg/mL, phụ thuộc vào thư viện và vòng chọn lựa. Các chọn lựa được tiến hành theo giao thức sau: (i) gắn kết của $\sim 10^{12}$ phần tử phagemit của thư viện a.m.FAP2D9, a.m.FAP4B8 hoặc a.m.FAPpool để FAP người hoặc chuột được giữ cố định trong 2 giờ; (ii) rửa sạch các ống miễn dịch bằng cách sử dụng 10 – 20 × 5 mL PBS/Tween20 và 10 – 20 × 5 mL PBS (phụ thuộc vào thư viện và vòng chọn lựa); (iii) tách rửa các phần tử thể thực khuẩn bằng việc bổ sung 1 mL 100m M TEA (triethylamin) trong 10 phút và trung hòa bằng việc bổ sung 500 µL 1M Tris/HCl pH 7,4; và (iv) tái nhiễm của các tế bào *E. coli* TG1 giai đoạn loga, nhiễm với thể thực khuẩn trợ giúp VCSM13 và sau sự kết tủa PEG/NaCl của các phần tử phagemit để được sử dụng trong các vòng sau chọn lựa.

Các chọn lựa được tiến hành hơn 2 vòng và các điều kiện được điều chỉnh cho mỗi trong số 3 thư viện cá thể. Chi tiết, các thông số chọn lựa là: a.m.FAP2D9 (5 µg /mL FAP người và 20 lần rửa trong tổng số cho vòng 1, 1 µg/mL FAP người và 30 lần rửa trong tổng số cho vòng 2), a.m.FAP4B8 (1 µg/mL FAP chuột và 30 lần rửa trong tổng số cho vòng 1, 0,2 µg/mL FAP người

và 40 lần rửa trong tổng số cho vòng 2) và a.m.FAPpool (5 $\mu\text{g/mL}$ FAP người và 30 lần rửa trong tổng số cho vòng 1, 5 $\mu\text{g/mL}$ FAP chuột và 30 lần rửa trong tổng số cho vòng 2). Các chất gắn kết đặc hiệu được xác định như các tín hiệu 5 $\times$ cao hơn nền và được xác định bằng ELISA. Các tấm maxisorp NUNC được phủ bằng 1 $\mu\text{g/mL}$ hoặc 0,2 $\mu\text{g/mL}$ của FAP người hoặc chuột tiếp theo bằng việc bổ sung các vi khuẩn thể nổi có chứa Fab và phát hiện về các Fabs được gắn kết cụ thể nhờ các đích của chúng bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng Flag/HRP.

Các vô tính dương ELISA được biểu hiện do vi khuẩn như 1 ml nuôi cấy ở dạng 96 giếng và các thể nổi được trải qua thử nghiệm quét động lực học bằng cách sử dụng BIACORE T100, như được mô tả ở trên (xem Ví dụ 3).

Chọn lựa bổ sung của các dòng vô tính kháng FAP ái lực hoàn thiện

Các chọn lựa được tiến hành kháng lại miền ngoài của protein kích hoạt nguyên bào sợi người và chuột (FAP) trong đó được nhân dòng ngược chiều nhãn 6x-lyzin và 6x-his (xem SEQ ID NO: 317 và 319). Trước khi chọn lựa, các kháng nguyên được phủ trong các ống miễn dịch ở nồng độ hoặc là 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,2 $\mu\text{g/mL}$ hoặc 0,02 $\mu\text{g/mL}$, phụ thuộc vào thư viện và chu kỳ chọn lựa. Các chọn lựa và ELISA-dựa vào quá trình quét được tiến hành như được mô tả để sự vận động hoàn thiện ái lực của các kháng thể kháng FAP. Quá trình quét thứ hai được tiến hành bằng cách sử dụng cảm biến sinh học ProteOn XPR36 (Biorad), và các hằng số tốc độ động lực học và các ái lực được xác định sự phân tích các sự điều chế Fab ái lực được tinh chế trên cùng dụng cụ. K_D được đo bằng sự cộng hưởng Plasmon bề mặt bằng cách sử dụng máy ProteOn XPR36 (Biorad) ở 25°C với kháng thể gắn kết đặc hiệu đoạn F(ab')₂ kháng người (Jackson ImmunoResearch #109-005-006) được giữ cố định trên các mạch GLM và sự thu giữ sau của Fabs từ thể nổi vi khuẩn hoặc từ các sự điều chế Fab được tinh chế. Trong một thời gian ngắn, các mạch cảm biến sinh học GLM (Biorad) được kích hoạt trong 5 phút với hỗn hợp tươi được điều chế của N-etyl-N'-(3-

dimethylaminopropyl)-cacbodiimit hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuxinimit (NHS). Kháng thể gắn kết đặc hiệu đoạn F(ab')₂ kháng người được pha loãng đến 24 µg/ml với 10 mM natri axetat, pH 5,0 trước khi tiêm trong 5 phút để đạt được xấp xỉ lên đến 10.000 đơn vị phản ứng (RU) của kháng thể thu giữ được cặp đôi. Tiếp theo việc tiêm của kháng thể thu giữ, 1 M etanolamin được tiêm trong 5 phút để chặn các nhóm không phản ứng. Để đo động lực học, Fabs từ thể nổi vi khuẩn được tiêm ở tốc độ dòng chảy 30 µl/phút trong 100 giây. Các mức độ được thu giữ trong phạm vi 250 RU. Trong bước sau, các chuỗi pha loãng của phép phân tích FAP người, chuột hoặc khỉ cynomolgus được tiêm (pha loãng hai lần, nồng độ cao nhất 25 nM) được pha loãng trong PBS/0,005% Tween-20 ở 25°C ở tốc độ dòng chảy 50 µl/phút. Thời gian kết hợp là 240 giây, thời gian phân ly 600 đến 1800 giây. Mạch cảm ứng được tái tạo bằng cách tiêm 0,85% H₃PO₄ trong 30 giây ở 100 µl/phút tiếp theo bằng cách tiêm 50 mM NaOH trong 30 giây ở cùng tốc độ dòng chảy. Các tốc độ kết hợp (k_{on}) và các tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một-đến-một đơn giản (phiên bản 2.1 phần mềm quản lý ProteOn) bởi sự phù hợp đồng thời các sensorgram liên kết và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính như tỷ lệ k_{off}/k_{on} .

Các dòng vô tính ái lực-đã trưởng thành sau được xác định: 19G1 (xem SEQ ID NO: 257 và 259), 20G8 (xem SEQ ID NO: 281 và 263), 4B9 (xem SEQ ID NO: 265 và 267), 5B8 (xem SEQ ID NO: 269 và 271), 5F1 (xem SEQ ID NO: 273 và 275), 14B3 (xem SEQ ID NO: 277 và 279), 16F1 (xem SEQ ID NO: 281 và 283), 16F8 (xem SEQ ID NO: 285 và 287), O3C9 (xem SEQ ID NO: 289 và 291), 22A3 (xem SEQ ID NO: 301 và 303) và 29B11 (xem SEQ ID NO: 305 và 307) (tất cả các dòng vô tính được chọn từ thư viện H1/H2 và có nguồn gốc từ dòng vô tính mẹ 3F2), O2D7 (xem SEQ ID NO: 293 và 295) (được chọn từ thư viện L3 dựa vào dòng vô tính mẹ 3F2), và 28H1 (xem SEQ ID NO: 297 và 299) và 23C10 (xem SEQ ID NO: 309 và 311) (hai dòng vô tính này được chọn từ thư viện H1/H2 và có nguồn gốc từ dòng vô tính mẹ 4G8).

Fig. 1 đến 5 thể hiện các sensorgram cộng hưởng plasmon bề mặt của các Fab ái lực hoàn thiện được chọn gắn kết với FAP được giữ cố định và Bảng 7 đưa ra các ái lực có nguồn gốc tương ứng. Các Fab được chọn mở rộng phạm vi pM đến phạm vi nM ái lực cao và là phản ứng ngang cho FAP người (hu) và chuột (mu) FAP, cũng như Khỉ cynomolgus (xyno) như được xác định đối với các vô tính được chọn. Ái lực hoàn thiện kháng FAP Fabs được biến đổi thành dạng Fab-IL2-Fab và thành các kháng thể IgG cho phân tích đặc hiệu. Đặc trưng của gắn kết được thể hiện bởi sự thiếu hụt gắn kết với DPPIV như chất đồng đẳng gần của FAP, được biểu hiện trên các tế bào HEK293 hoặc CHO (xem Ví dụ 9).

Bảng 7.

Tóm tắt về các hằng số cân bằng động lực học (K_D) của các kháng thể kháng FAP ái lực hoàn thiện như các đoạn Fab (gắn kết đơn trị).

Kháng thể	Ái lực (K_D) với hu FAP (pM)	Ái lực (K_D) với mu FAP (pM)	Ái lực (K_D) với xyno FAP (pM)
19G1	76	2600	n.d.
20G8	69	2800	n.d.
4B9	157	3300	n.d.
5B8	690	3200	n.d.
5F1	243	4100	n.d.
14B3	377	3800	n.d.
16F1	193	3400	n.d.
16F8	301	3800	n.d.
O3C9	160	3700	n.d.
O2D7	619	8300	n.d.
28H1	200	9	3600
22A3	34	655	522
29B11	35	436	23
23C10	1600	125	990

Ví dụ 6

Sự chuyển đổi IgG của các Fab gắn kết FAP

Các Fabs 3F2, 4G8 và 3D9 mẹ và các dẫn xuất Fab 3F2 và 4G8 ái lực hoàn thiện đã được biến đổi thành định dạng IgG1 người, định dạng IgG2 chuột và định dạng IgG1 người.

Toàn bộ các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể đã thu được hoặc bằng vô tính phụ các vùng biến đổi trong cấu trúc với các vùng chuỗi nặng ổn định và chuỗi nhẹ ổn định tương ứng được chèn vào trước trong các vector biểu hiện động vật có vú tiếp nhận khác nhau hoặc được tái kết hợp bằng cách hợp nhất khoảng cách trình tự ngắn tương ứng với vị trí chèn các vector tiếp nhận. Sự tái kết hợp được thực hiện theo “Hệ thống vô tính trong khi hợp nhất” từ Invitrogen.

Trong tất cả các vector sự biểu hiện kháng thể được truyền bởi một chất hoạt hóa MPSV và tất cả các vector tiến hành một trình tự tín hiệu polyA tổng hợp ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, mỗi vector chứa một trình tự EBV OriP.

Ví dụ 7

Phân tích BIACORE về các kháng thể IgG kháng FAP

Ái lực của các đoạn Fab kháng FAP 3F2, 4G8 và 3D9 cũng như của các kháng thể kháng FAP được biến đổi IgG1 người sau đó được xác định và được xác nhận cho FAP người, chuột và khỉ cynomolgus bằng sự phân tích cộng hưởng Plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C bằng cách sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare). Đối với mục đích này, người, miễn ngoại bào FAP chuột hoặc Khỉ cynomolgus (SEQ ID NO: 317-322) được giữ bởi kháng thể kháng His được giữ cố định (Penta His Qiagen 34660) và các kháng thể được sử dụng như các phép phân tích. Để giữ cố định các mạch cảm biến sinh học dextran được cacboxymetylat (CM5, GE Healthcare) được kích hoạt bằng N-etyl-N'-(3-

dimethylaminopropyl)-cacbodiimit hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuxinimit (NHS) theo các hướng dẫn của nhà cung cấp. Năm kháng His được pha loãng với 10 mM axetat natri, pH 5, đến 40 µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ dòng chảy 10 µl/phút để đạt được xấp xỉ 9000 đơn vị phản ứng (RU) của protein ghép cặp. Tiếp theo việc tiêm của phối tử ligand, 1 M etanolamin được tiêm để chặn các nhóm không phản ứng.

Để đo các động lực học, miễn ngoại bào FAP người, chuột hoặc Khỉ cynomolgus được tiêm ở 10 µl/phút ở 10 nM trong 20 giây (cho các đoạn Fab) hoặc ở 20 nM trong 25 giây (cho IgG) và được giữ nhờ nhãn His của nó bằng kháng thể năm His được giữ cố định. Các chuỗi pha loãng của kháng thể (pha loãng hai lần, phạm vi giữa 6,25 nM đến 200 nM cho các đoạn Fab hoặc pha loãng năm lần, phạm vi giữa 3,2 pM đến 10 nM cho IgG) được tiêm trong HBS-EP+ (GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất có hoạt tính bề mặt P20, pH 7,4) ở 25°C ở tốc độ dòng chảy 90 µl/phút. Các thông số sau được áp dụng: Thời gian kết hợp 180 giây, phân ly 300 giây (cho Fab) hoặc 900 giây (cho IgG), phục hồi với 10 mM glyxin pH 2 trong 60 giây giữa mỗi chu kỳ. Các tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một-đến-một đơn giản (phiên bản 1.1.1 Phần mềm đánh giá BIACORE® T100) bằng cách làm cho phù hợp đồng thời các sensorgram liên kết và phân ly (các thông số mô hình cục bộ R_{max} và $RI=0$). Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính như tỷ lệ k_{off}/k_{on} .

Các giá trị K_D của gắn kết được đưa ra trong Bảng 8. Fig. 6 A-C thể hiện các phân tích động học dựa vào SPR tương ứng cho các đoạn Fab, Fig. 7 A-C cho các kháng thể IgG.

Bảng 8.

Tóm tắt về các hằng số cân bằng động lực học (K_D) của kháng thể kháng FAP 3F2, 4G8 và 3D9 như các đoạn Fab và như IgG

Cấu trúc	Người FAP	Chuột FAP	Xyno FAP
IgG 3F2	Ái lực: 39 pM	Ái lực: 29 pM	Ái lực: 42 pM
IgG 4G8	Ái lực: 51 pM	Ái lực: 1 pM	Ái lực: 59 pM
IgG 3D9	Ái lực: 93 pM	Ái lực: 96 pM	Ái lực: 96 pM
đoạn 3F2 Fab	Ái lực: 13 nM	Ái lực: 14 nM	Ái lực: 11 nM
đoạn 4G8 Fab	Ái lực: 74 nM	Ái lực: 7 nM hoặc thấp hơn	Ái lực: 56 nM
đoạn 3D9 Fab	Ái lực: 133 nM	Ái lực: 32 nM	Ái lực: 143 nM

Ví dụ 8

Gắn kết của các kháng thể kháng FAP 3F2, 4G8 và 3D9 trên các phần cắt mô khối u người

Các thử nghiệm được thực hiện để dò tìm và so sánh biểu hiện của FAP trong các mô khối u được làm lạnh tươi (ung thư vú, ung thư tuyến đại tràng và các mô NSCLC) bằng cách sử dụng các dòng vô tính các kháng thể kháng FAP 3F2, 4G8 và 3D9 như IgG2a chuột.

Một mô gen chip được làm lạnh tươi (TMA) (AST 274), có chứa ba mươi khối u khác nhau với hai dấu riêng rẽ, được sử dụng từ ngân hàng khối u Roche TRS Pathology & Mô Đánh dấu sinh học. TMA có chứa 10 ung thư biểu mô ống tuyến xâm chiếm của vú, 10 ung thư tuyến đại trực tràng và 10 ung thư phổi tế bào không nhỏ đã thu được từ Asterand Ltd, Royston, UK.

Đối với các đổi màu mô hóa học miễn dịch (IHC), các kháng thể sau được sử dụng: dòng vô tính 3F2 FAP kháng người chuột đơn dòng (15,8 ng/ml, được pha loãng trong chất pha loãng kháng thể Ventana), dòng vô tính 4G8 FAP kháng người chuột đơn dòng (1000 ng/ml, được pha loãng trong chất pha loãng

kháng thể Ventana), và dòng vô tính, 3D9 FAP kháng người chuột đơn dòng (1000 ng/ml, được pha loãng trong chất pha loãng kháng thể Ventana). Một IgG2a chuột đa dòng, nồng độ 100µg/mL (Nhà cung cấp: DAKO, X0943, lot #00058066) được sử dụng như sự kiểm soát isotyp.

Những sự đổi màu được thực hiện theo các giao thức tiêu chuẩn trên dụng cụ Ventana Benchmark XT, bằng cách sử dụng kit phát hiện Ventana Ultra-View với hệ thống HRP để phát hiện (có chứa Universal HRP Multimer, và DAB để đổi màu). Sự đổi màu ngược được thực hiện với Hematoxylin II (Ventana, Mayer's Hematoxylin) và phản ứng Blueing (Ventana) trong 8 phút.

TMA được phân tích biểu hiện FAP tổng số và bán định lượng (cường độ được đổi màu) cũng như việc định vị sự biểu hiện FAP trong mô khối u được đánh giá.

Với toàn bộ ba kháng thể kháng FAP, tất cả các mẫu mô khối u (ung thư vú, ung thư đại trực tràng và ung thư phổi) mà có thể được đánh giá đã thể hiện sự giảm nhẹ tới cường độ tín hiệu FAP được đổi màu mạnh trong thành phần đệm của khối u. Ít nhất 7 ngoài 10 mẫu cho mỗi khối u và kháng thể có thể được đánh giá. Các mẫu còn lại có thể không được đánh giá, vì các lõi mô có các tạp chất gấp nếp, chỉ chứa mô bình thường, hoặc đã không có mặt.

Như mong đợi, tín hiệu FAP được định vị không thay đổi trong thành phần đệm của các khối u. Đã có đôi chút khác biệt về cường độ tín hiệu giữa 3F2 vô tính và các 3D9 và 4G8 vô tính. Một tín hiệu mạnh hơn đôi chút được quan sát với các 3D9 và 4G8 vô tính, tuy nhiên sự khác biệt là nhỏ.

Fig. 8 A-D thể hiện các khảo sát bằng kính hiển vi đại diện của các mẫu mô khối u người hóa học miễn dịch được đổi màu cho FAP bằng cách sử dụng IgG2a 3F2, 3D9 hoặc 4G8 chuột kháng FAP, hoặc kháng thể kiểm soát isotyp.

Ví dụ 9

Gắn kết của các kháng thể kháng FAP với FAP trên các tế bào

Gắn kết của các kháng thể người IgG1 3F2, 4B3 và 4G8 với FAP người và chuột được biểu hiện trên các tế bào HEK293 được chuyển nạp ổn định được đo bằng FACS. Trong một thời gian ngắn, 150,000 tế bào trên mỗi giếng được nuôi cấy với nồng độ chỉ định của các kháng thể kháng FAP 3F2, 4B3 và 4G8 trong một tấm 96 giếng đáy tròn, được nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C, và được rửa một lần với PBS/0,1 % BSA. Kháng thể gắn kết được phát hiện đặc hiệu bằng F(ab')₂ dê kháng người đoạn F(ab')₂ AffiniPure được tiếp hợp FITC (Jackson Immuno Research Lab #109-096-097, dung dịch hoạt động: 1:20 được pha loãng trong PBS/0,1% BSA, được điều chế tươi) sau khi nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C bằng cách sử dụng FACS CantoII (Phần mềm FACS Diva). Các kết quả được thể hiện trong Fig. 9. Các giá trị EC₅₀ ở gắn kết phân nửa tối đa đối với gắn kết với FAP người và chuột được xác định và được đưa ra trong Bảng 9.

Bảng 9.

Gắn kết của các kháng thể kháng FAP với FAP trên các tế bào (các giá trị EC₅₀).

	Các giá trị EC ₅₀ trên các tế bào (nM)	
	FAP người	FAP chuột
IgG 3F2	4,8	1,0
IgG 4B3	5,5	1,6
IgG 4G8	5,0	1,7

Tính đặc hiệu của kháng thể FAP

Để đánh giá tính đặc hiệu gắn kết của thể thực khuẩn hiển thị có nguồn gốc từ các kháng thể, gắn kết với HEK293 các tế bào ổn định biểu hiện DPPIV (một chất đồng đẳng gần của FAP được biểu hiện trên các mô khỏe mạnh) hoặc HER2 được đo đối với các kháng thể IgG1 người kháng FAP 3F2, 4B3 và 4G8. Trong một thời gian ngắn, 200.000 tế bào trên mỗi giếng (HEK293-DPPIV hoặc HEK293-HER2 như kiểm soát) được nuôi cấy với 30 µg/ml của các kháng thể kháng FAP 3F2, 4B3 hoặc 4G8 trong một tấm 96 giếng đáy tròn, được nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C và được rửa một lần bằng PBS/0,1 % BSA. Trastuzumab

(kháng thể kháng HER2) hoặc phycoerythrin kháng thể kháng CD26/DPPIV kháng người chuột được tiếp hợp (PE) (CD26 = DPPIV, sinh học IgG1,k, BD chuột, #555437, M-A261 vô tính) được sử dụng làm đối chứng dương. Kháng thể gắn kết được phát hiện đặc hiệu bằng Fc γ IgG dê kháng người đoạn F(ab')₂ AffiniPure được tiếp hợp PE (Jackson Immuno Research Lab #109-116-170, dung dịch hoạt động: 1:20 được pha loãng trong PBS/0,1% BSA, được điều chế tươi) sau khi nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C bằng cách sử dụng FACS CantoII (Phần mềm FACS Diva). Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 10. Không có kháng thể kháng FAP nào thể hiện đáng kể gắn kết với DPPIV hoặc HER2, nhưng các tín hiệu trong phạm vi của các đối chứng âm (chỉ riêng kháng thể thứ cấp, kháng thể kiểm soát isotyp, hoặc không có kháng thể ở toàn bộ).

Gắn kết của các kháng thể kháng FAP với FAP trên các nguyên bào sợi người

Gắn kết của các kháng thể IgG1 người với FAP người được biểu hiện trên dòng tế bào nguyên bào sợi người GM05389 (có nguồn gốc từ bào thai phổi người, National Institute of General Medical Sciences, Camden, NJ) được đo bằng FACS. Trong một thời gian ngắn, 200.000 tế bào trên mỗi giếng được nuôi cấy với 30 μ g/ml của các kháng thể kháng FAP 3F2 hoặc 4G8 trong tám 96 giếng đáy tròn, được nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C và được rửa một lần với PBS/0,1 % BSA. Kháng thể gắn kết được phát hiện đặc hiệu bằng Fc γ IgG dê kháng người đoạn F(ab')₂ AffiniPure được tiếp hợp FITC (Jackson Immuno Research Lab #109-096-098, dung dịch hoạt động: 1:20 được pha loãng trong PBS/0,1% BSA, được điều chế tươi) sau khi nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C bằng cách sử dụng FACS CantoII (Phần mềm FACS Diva). Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 11. Cả hai kháng thể kháng FAP gắn kết mạnh với FAP được biểu hiện trên các nguyên bào sợi người.

Gắn kết của các kháng thể kháng FAP với FAP trên các tế bào khối u người

Gắn kết của các kháng thể IgG1 người với FAP người được biểu hiện trên các nguyên bào sợi người dòng tế bào GM05389 và trên các tế bào HEK293 được chuyển nạp ổn định so với sự biểu hiện FAP trên các dòng tế bào ung thư người ACHN, Colo205, MDA-MB231, MDA-MB435 và KPL4 bởi FACS.

Trong một thời gian ngắn, 200.000 tế bào trên mỗi giếng được nuôi cấy với 10 µg/ml của các kháng thể kháng FAP 3F2 hoặc 4G8 trong một tấm 96 giếng đáy tròn, được nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C và được rửa một lần với PBS/0,1 % BSA. Kháng thể gắn kết được phát hiện với Đoạn F(ab')₂ AffiniPure được tiếp hợp FITC thể đặc hiệu F(ab')₂ kháng người (Jackson Immuno Research Lab #109-096-097, dung dịch hoạt động: 1:20 được pha loãng trong PBS/0,1% BSA, được điều chế tươi) sau khi nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C bằng cách sử dụng FACS CantoII (Phần mềm FACS Diva). Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 12. Dữ liệu thể hiện rằng các kháng thể 3F2 và 4G8 gắn kết cụ thể là với FAP được biểu hiện quá mức mạnh trên các nguyên bào sợi và các tế bào HEK293 được chuyển nạp ổn định; trong khi chỉ gắn kết yếu là có thể được phát hiện trên các dòng tế bào khối u người ACHN, Colo205, MDA-MB231, MDA-MB435 và KPL4.

Ví dụ 10

Phân tích về đồng hóa FAP nhờ sự gắn kết của kháng thể kháng FAP bởi FACS

Đối với một vài kháng thể FAP đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật được mô tả rằng chúng gây ra đồng hóa FAP nhờ sự gắn kết (ví dụ, được mô tả trong Baum et al., *J Drug Target* 15, 399-406 (2007); Bauer et al., *Journal of Clinical Oncology*, 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), vol. 28 (Có thể 20 Supplement), tóm tắt số 13062 (2010); Ostermann et al., *Clin Cancers Res* 14, 4584-4592 (2008)).

Nhờ đó, chúng được phân tích các đặc tính đồng hóa của các kháng thể của chúng. Trong một thời gian ngắn, các tế bào GM05389 (các nguyên bào sợi phổi người,) được nuôi cấy trong môi trường EMEM + 15% FCS, được tách, được

rửa, được đếm, được kiểm tra về khả năng tồn tại và được gieo ở mật độ 0,2 triệu tế bào/giếng trong các tấm 12 giếng. Ngày tiếp theo, các kháng thể FAP 4G8 và 3F2 (Fig. 13A) hoặc chỉ 4G8 (Fig. 13B) được pha loãng đến 10 µg/ml trong môi trường lạnh, các tế bào được làm lạnh bằng nước đá và các kháng thể được pha loãng (0,5 ml/giếng) hoặc chỉ riêng môi trường được bổ sung như chỉ định. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong 30 phút trong phòng lạnh có lắc nhẹ, tiếp theo bằng việc bổ sung của 0,5 ml môi trường ấm và nuôi cấy tiếp các tế bào ở 37°C đối với các giai đoạn thời gian chỉ định. Tại các thời điểm chỉ định được hoàn thành, các tế bào được truyền đến đá, được rửa một lần với PBS lạnh và được nuôi cấy với 0,4 ml của kháng thể thứ cấp (IgG người kháng dê được tiếp hợp Alexa Fluor 633-, các máy dò phân tử #A-21091, 2 mg/ml, sử dụng 1:500) trong 30 phút ở 4°C. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS/0,1 % BSA, được truyền đến một tấm 96 giếng, được ly tâm trong 4 phút ở 4°C, 400 x g và các viên tế bào được tạo huyền phù lại bằng cách trộn. Các tế bào được cố định bằng cách sử dụng 100 µl 2% PFA. Để đo FACS, các tế bào được tạo huyền phù lại trong 200 µl/mẫu PBS/0,1% BSA và được đo bằng giao thức tấm trong FACS CantoII (Phần mềm FACS Diva). Các kết quả của các thử nghiệm này được trình bày trong Fig. 13 A và B, và thể hiện rằng các kháng thể kháng FAP 4G8 và 3F2 không gây ra sự đồng hóa của FAP trên các nguyên bào sợi.

Phân tích về đồng hóa FAP nhờ sự gắn kết của kháng thể kháng FAP bằng miễn dịch huỳnh quang

Các tế bào GM05389 (các nguyên bào sợi phổi người) được phát triển trên các mảnh thủy tinh trong môi trường EMEM + 15 % FCS. Trước khi điều trị, các tế bào được rửa ba lần với PBS và được để đói trong môi trường EMEM + 0,1 % BSA trong 2 giờ. Kháng thể kháng FAP (4G8 IgG) hoặc kháng thể kháng CD20 (GA101, được sử dụng như là sự kiểm soát isotyp) được pha loãng trong môi trường EMEM lạnh đến nồng độ cuối cùng là 10 µg/ml. Sau khi để đói, các tế bào được làm lạnh trên đá, được rửa hai lần bằng PBS lạnh và được nuôi cấy

với các kháng thể được pha loãng (0,5 ml/giếng) trong 45 phút ở 4°C dưới trạng thái ổn định để cho phép bề mặt gắn kết. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS lạnh và hoặc được cố định bằng PFA lạnh (T0, paraformaldehyt 4 % trong PBS pH 7,4) hoặc được nuôi cấy tiếp ở 37°C trong 20 phút, 1 giờ, 3 giờ và 6 giờ trong EMEM + 10 % FCS. Ở mỗi thời điểm, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS lạnh và PFA được cố định trong 20 phút trên đá. Sau khi cố định, các tế bào được rửa bốn lần bằng PBS lạnh, được thấm qua Triton 0,03% và được nuôi cấy với kháng thể kháng EEA1 (vật ghi hạt cơ quan nội bào trước) trong 45 phút ở nhiệt độ phòng trong bộ đệm chặn (PBS + 10% FCS). Sau đó, các tế bào được rửa ba lần bằng PBS và được nuôi cấy với các kháng thể thứ cấp được gắn nhãn huỳnh quang (kháng thể Alexa Fluor 594 được tiếp hợp chuột kháng lừa, và kháng thể Alexa Fluor 488 được tiếp hợp dê kháng người) ở nhiệt độ phòng trong hơn 45 phút. Cuối cùng, các tế bào được rửa và được gắn trên các ván trượt hỗ trợ thủy tinh bằng cách sử dụng môi trường gắn Immuno Mount.

Fig. 14 A-D mô tả các hình ảnh miễn dịch huỳnh quang đại diện thể hiện rằng màng huyết thanh FAP được đổi màu trên các nguyên bào sợi phổi GM05389 đã thu được sau khi sự gắn kết của IgG 4G8 kháng FAP trong 45 phút ở 4°C (A), trong 20 phút ở 37°C (B), trong 1 giờ ở 37°C (C) hoặc trong 6 giờ ở 37°C (D). Kháng thể GA101 kháng CD20 được sử dụng như sự kiểm soát isotyp, thể hiện nền được đổi màu. EEA1 gắn nhãn các hạt cơ quan nội bào trước. Lưu ý rằng sự tồn tại của màng huyết thanh bề mặt FAP được đổi màu lên đến 6 giờ sau khi gắn kết kháng thể 4G8 kháng FAP.

Ví dụ 11

Phân tích BIACORE của các kháng thể IgG kháng FAP ái lực hoàn thiện

Các đoạn Fab kháng FAP ái lực hoàn thiện có nguồn gốc từ 3F2 và 4G8 được biến đổi thành các kháng thể IgG nhỏ. Ái lực của ái lực hoàn thiện 3F2 và 4G8 dựa vào IgG1 nhỏ được biến đổi các kháng thể kháng FAP thành FAP sau đó được xác định và được xác nhận cho FAP người, chuột và Khỉ cynomolgus

bằng phân tích SPR ở 25°C (BIAcore). Đối với mục đích này, miễn ngoại bào FAP người, chuột hoặc Khỉ cynomolgus (SEQ ID NO: 317-322) được giữ bằng một kháng thể kháng His được giữ cố định (Penta His Qiagen 34660) và các kháng thể được sử dụng như các phép phân tích. Các IgGs được pha loãng 1:5 từ 10 nM đến 3,2 pM. Các thông số sau được áp dụng: Thời gian kết hợp 180 giây, phân ly 900 giây, lưu lượng 90 µl/phút. Phục hồi với 10 mM glyxin pH 2 trong 60 giây. Các đường cong được làm cho phù hợp với mô hình 1:1 để tạo thành các giá trị K_D (R_{max} cục bộ, $RI=0$).

Ví dụ 12

Gắn kết của các kháng thể kháng FAP ái lực hoàn thiện với FAP trên các tế bào

Gắn kết của kháng thể 28H1 IgG1 người ái lực hoàn thiện được gắn nhãn với Alexa-647 (1,89 mg/ml, 1,83 nhuộm mol/protein mol) có nguồn gốc từ kháng thể mẹ 4G8 với FAP người được biểu hiện trên các tế bào HEK293 được chuyển nạp ổn định được đo bằng FACS. Trong một thời gian ngắn, 200.000 tế bào trên mỗi giếng được nuôi cấy với nồng độ chỉ định 2 µg/ml và 10 µg/ml của 4G8 mẹ và các kháng thể kháng FAP 28H1 ái lực hoàn thiện trong một tấm 96 giếng đáy tròn, được nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C và được rửa một lần với PBS/0,1% BSA. Kháng thể gắn kết được phát hiện sau khi nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C bằng cách sử dụng FACS CantoII (phần mềm FACS Diva). Dữ liệu thể hiện rằng cả hai kháng thể gắn kết mạnh với các tế bào HEK293 được chuyển nạp với FAP người (Fig. 23).

Ví dụ 13

Gắn kết của các kháng thể kháng FAP ái lực hoàn thiện với FAP trên các nguyên bào sợi người

Gắn kết của các kháng thể IgG1 người ái lực hoàn thiện có nguồn gốc từ 3F2 với FAP người được biểu hiện trên dòng tế bào nguyên bào sợi người GM05389 (có nguồn gốc từ bào thai phổi người, National Institute of General Medical Sciences, Camden, NJ) được đo bằng FACS. Trong một thời gian ngắn,

200.000 tế bào trên mỗi giếng được nuôi cấy với 30 µg/ml của kháng thể kháng FAP 3F2 ái lực hoàn thiện trong một tấm 96 giếng đáy tròn, được nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C và được rửa một lần bằng PBS/0,1 % BSA. Kháng thể gắn kết được phát hiện đặc hiệu bởi Fcγ IgG dê kháng người đoạn F(ab')₂ AffiniPure được tiếp hợp FITC (Jackson Immuno Research Lab #109-096-098, dung dịch hoạt động: 1:20 được pha loãng trong PBS/0,1% BSA, được điều chế tươi) sau khi nuôi cấy trong 30 phút ở 4°C bằng cách sử dụng FACSCantoII (Phần mềm FACS Diva). Các giá trị EC₅₀ ở gắn kết tối đa một nửa để gắn kết với FAP người và chuột được xác định.

Ví dụ 14

Tính độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể qua trung gian bằng các kháng thể IgG1 kháng FAP được xử lý bằng glycogen

Các kháng thể kháng FAP IgG1 người có nguồn gốc từ 4G8 hoặc 3F2 được xử lý bằng glycogen bằng cách đồng chuyển nhiễm với các plasmit mã hóa đối với GnTIII và ManII như được mô tả trong Ví dụ 1. Sau đó, 4G8 và 3F2 mẹ được xử lý bằng glycogen và các kháng thể IgG1 người 28H1 ái lực hoàn thiện được so sánh trong một thử nghiệm ADCC về tiềm năng của chúng để làm trung gian cho tính gây độc tế bào qua trung gian kháng thể tốt hơn so với các phiên bản kiểu đại không được xử lý bằng glycogen của chúng.

Trong một thời gian ngắn, các tế bào ổn định HEK293 được chuyển nạp với FAP người như các tế bào đích được gom, được rửa và được tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi, được đổi màu với Calcein AM tươi được điều chế (các máy dò Phân tử) ở 37°C trong 30 phút, được rửa ba lần, được đếm và được pha loãng đến 300.000 các tế bào/ml. Huyền phù này được truyền đến một tấm 96 giếng đáy tròn (=30,000 tế bào/giếng), sự pha loãng kháng thể tương ứng được bổ sung và được nuôi cấy trong 10 phút để tạo điều kiện thuận lợi cho sự gắn kết của kháng thể được thử nghiệm với các tế bào trước khi tiếp xúc với các tế bào phản ứng. Phản ứng đến tỷ lệ đích là 25 đến 1 đối với các PBMCs. Đồng

nuôi cấy được thực hiện trong 4 giờ. Như là kết quả đọc được sự giải phóng của dehydrogenaza lactat (LDH) thành dạng nổi sau khi phân hủy của các tế bào bị ăn mòn được xác định. LDH từ đồng nuôi cấy nổi được gom và được phân tích bằng Kit phát hiện LDH (Roche Applied Science). Sự chuyển đổi chất nền bằng enzym LDH được đo bằng đầu đọc hấp thu ELISA (phần mềm SoftMaxPro, các độ dài sóng tham khảo: 490 nm chống lại 650 nm). Như được thể hiện trong Fig. 24 tất cả các kháng thể kháng FAP được thử nghiệm có khả năng gây ra ADCC trên các tế bào HEK293-hFAP. Các phiên bản được xử lý bằng glycogen (ge) được thực hiện luôn tốt hơn phiên bản kiểu dại tương ứng (wt) không được xử lý bằng glycogen.

Mặc dù sáng chế đã nói ở trên đã được được mô tả về một số chi tiết bằng cách miêu tả và ví dụ về mục đích để hiểu rõ sáng chế, phần mô tả và các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả các bằng sáng chế và các tài liệu khoa học được trích dẫn ở đây được viện dẫn toàn bộ bằng cách tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP), trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 267, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 265.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm vùng Fc hoặc vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch.
3. Kháng thể theo điểm 2, trong đó vùng Fc này là vùng Fc IgG.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là toàn bộ độ dài kháng thể lớp IgG.
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này bao gồm vùng ổn định của người.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này là kháng thể của người.
7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể này bao gồm vùng Fc được xử lý bằng glycogen.
8. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này có tỷ lệ các oligosacarit không được fucosylat hóa tăng trong vùng Fc khi so với kháng thể không được xử lý bằng glycogen.
9. Kháng thể theo điểm 7 hoặc 8, trong đó ít nhất khoảng từ 20% đến khoảng 100% của các oligosacarit liên kết N trong vùng Fc này không được fucosylat hóa.
10. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9, trong đó kháng thể này có tỷ lệ các oligosacarit phân cắt được tăng trong vùng Fc so với kháng thể không được xử lý bằng glycogen.

11. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 10, trong đó ít nhất khoảng từ 20% đến khoảng 100% các oligosacarit liên kết N trong vùng Fc phân cắt được.
12. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 11, trong đó ít nhất khoảng từ 20% đến khoảng 50% các oligosacarit liên kết N trong vùng Fc phân cắt được, không được fucosylat hóa.
13. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó kháng thể này có chức năng phản ứng tăng và/hoặc ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng.
14. Kháng thể theo điểm 13, trong đó chức năng phản ứng tăng này tăng gây độc trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).
15. Polynucleotit được phân lập mã hóa chuỗi nặng kháng thể và chuỗi nhẹ kháng thể tạo thành một phần kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.
16. Hỗn hợp bao gồm polynucleotit được phân lập thứ nhất mã hóa polypeptit bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 267, và polynucleotit được phân lập thứ hai mã hóa polypeptit bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 265.
17. Vector bao gồm polynucleotit theo điểm 15.
18. Tế bào chủ bao gồm polynucleotit theo điểm 15, hỗn hợp theo điểm 16, hoặc vector theo điểm 17.
19. Tế bào chủ theo điểm 18, trong đó tế bào chủ này đã được điều chỉnh để biểu hiện các mức độ tăng của một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính GnTIII.
20. Tế bào chủ theo điểm 19, trong đó polypeptit này có hoạt tính GnTIII là một polypeptit hợp nhất bao gồm miền xúc tác của GnTIII và miền định vị Golgi của ManII.

21. Tế bào chủ theo điểm 19 hoặc 20, trong đó tế bào chủ này đã được điều khiển tiếp để biểu hiện các mức độ tăng của một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính ManII.

22. Phương pháp tạo ra kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 18 trong môi trường dưới các điều kiện cho phép sự biểu hiện của kháng thể, và
- b) thu hồi kháng thể.

23. Phương pháp tạo ra kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein kích hoạt nguyên bào sợi (FAP), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào chủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 21 trong môi trường dưới các điều kiện cho phép sự biểu hiện của kháng thể và sự thay đổi của các oligosacarit bộc lộ trên vùng Fc của kháng thể này bằng polypeptit này có hoạt tính GnTIII, và
- b) thu hồi kháng thể.

24. Kháng thể gắn kết đặc hiệu với FAP, trong đó kháng thể này được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 22 hoặc 23.

25. Thẻ tiếp hợp kháng thể bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14 và một tác nhân gây độc.

26. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14 và một chất mang dược dụng.

27. Dược phẩm theo điểm 26, trong đó dược phẩm này còn bao gồm một tác nhân điều trị bổ sung.

Fig. 1

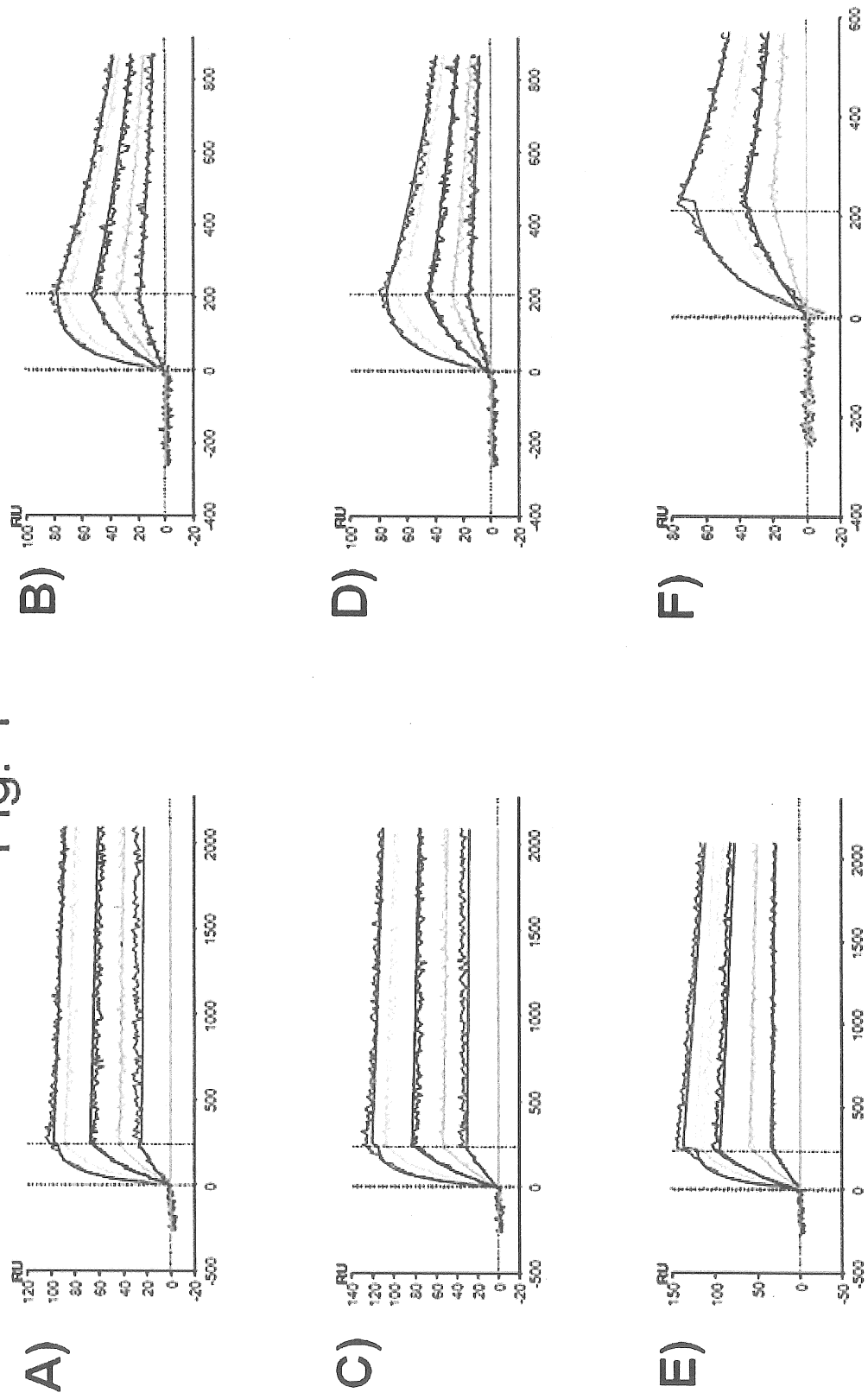


Fig. 2

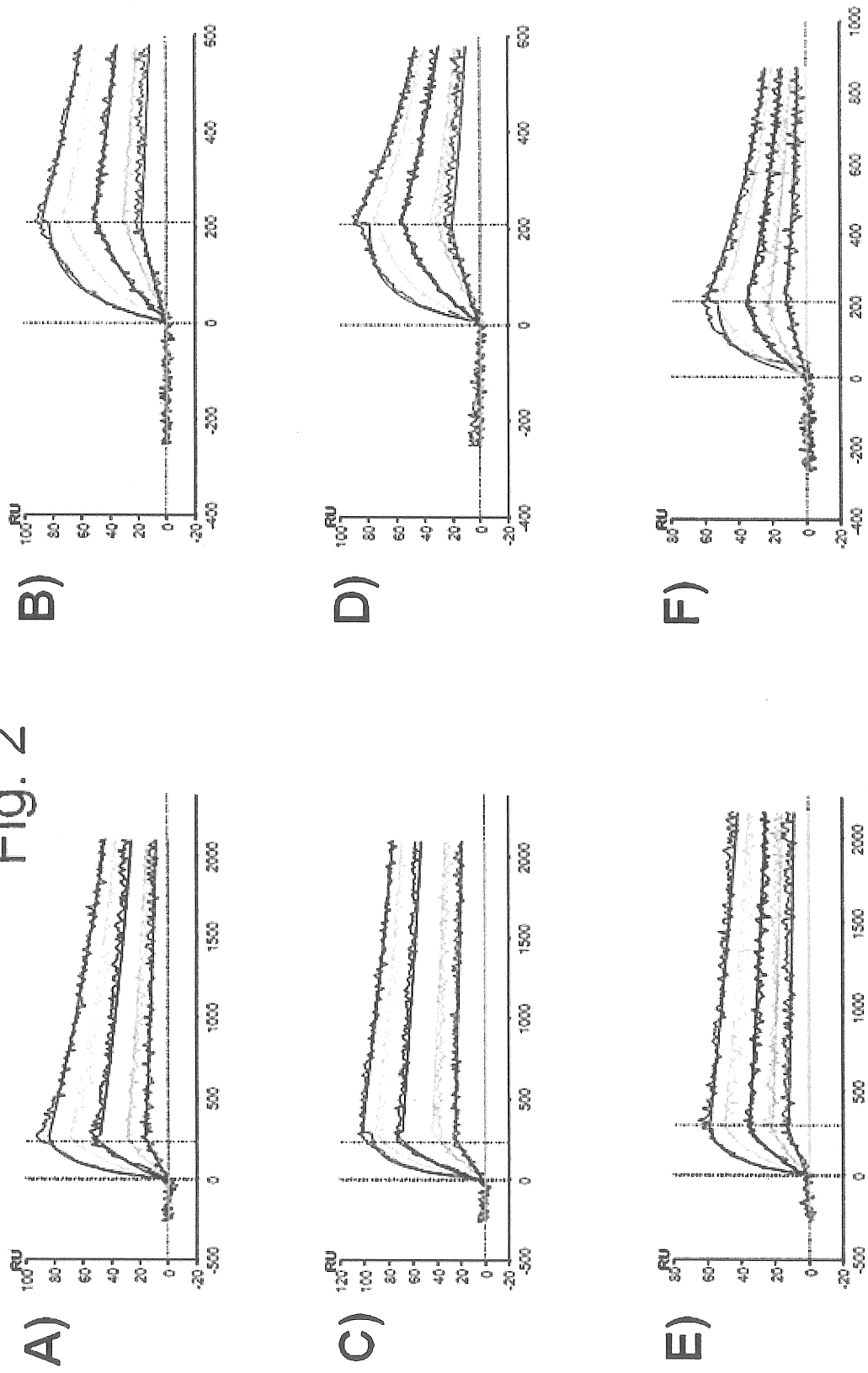


Fig. 3

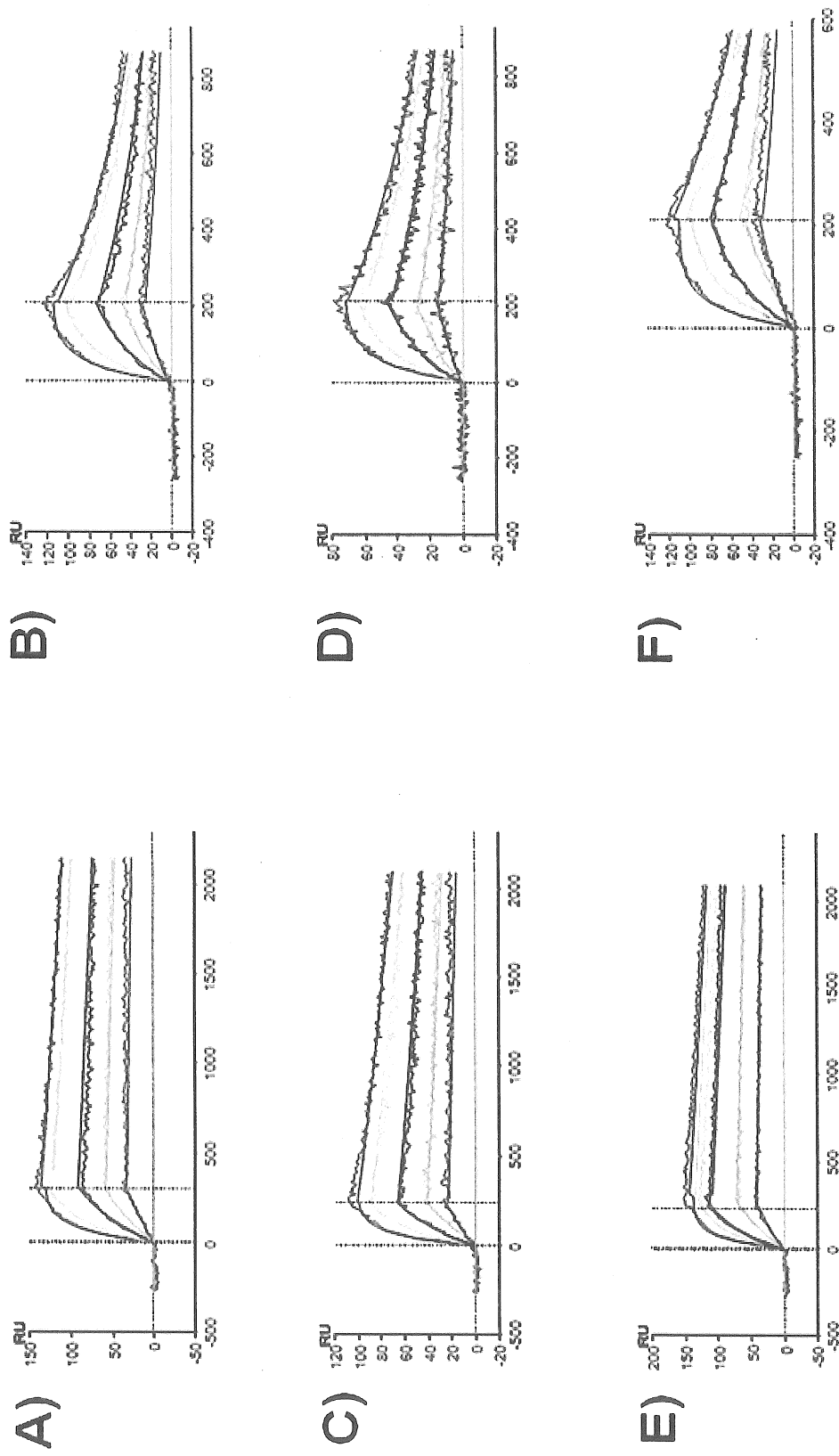


Fig. 4

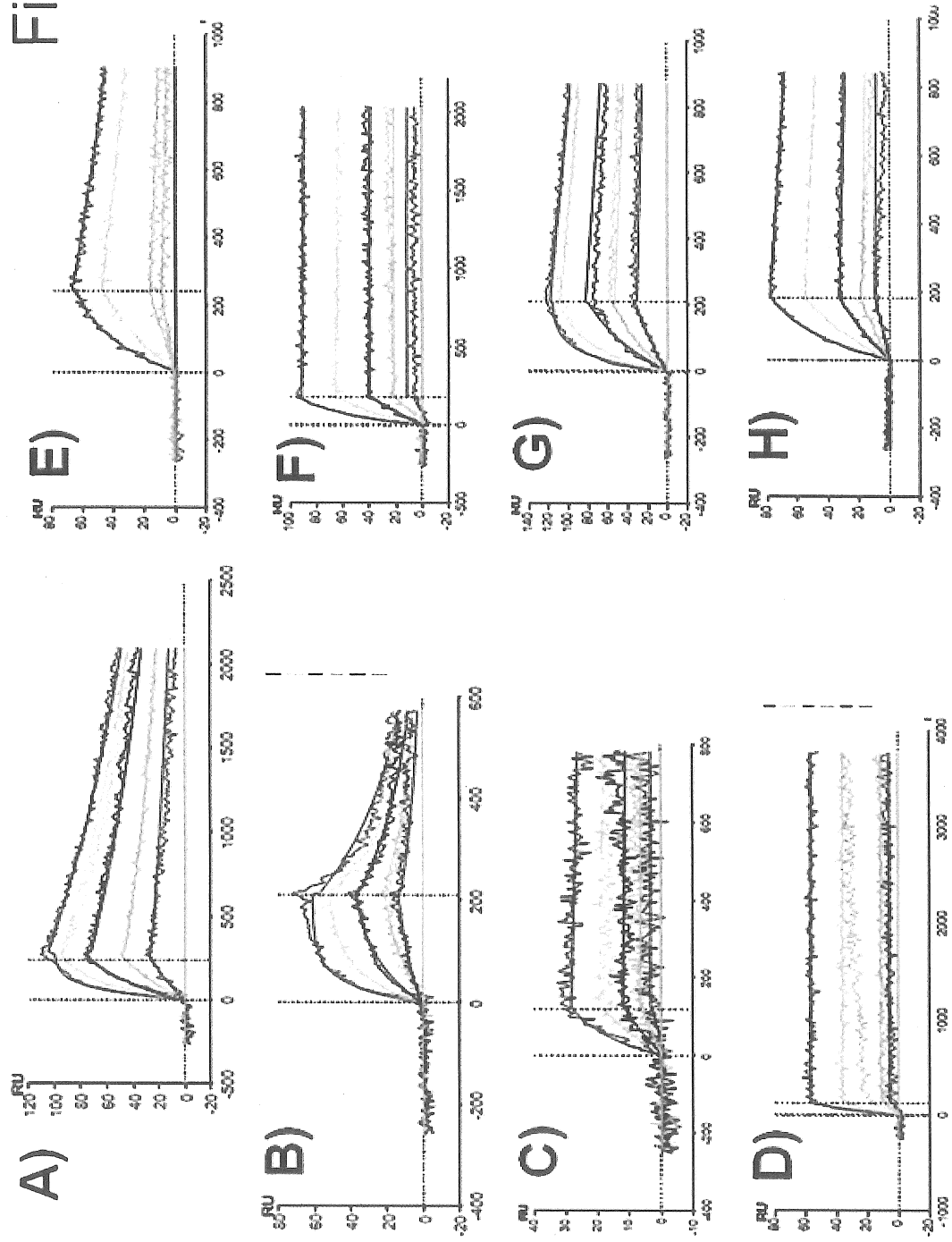


Fig. 5

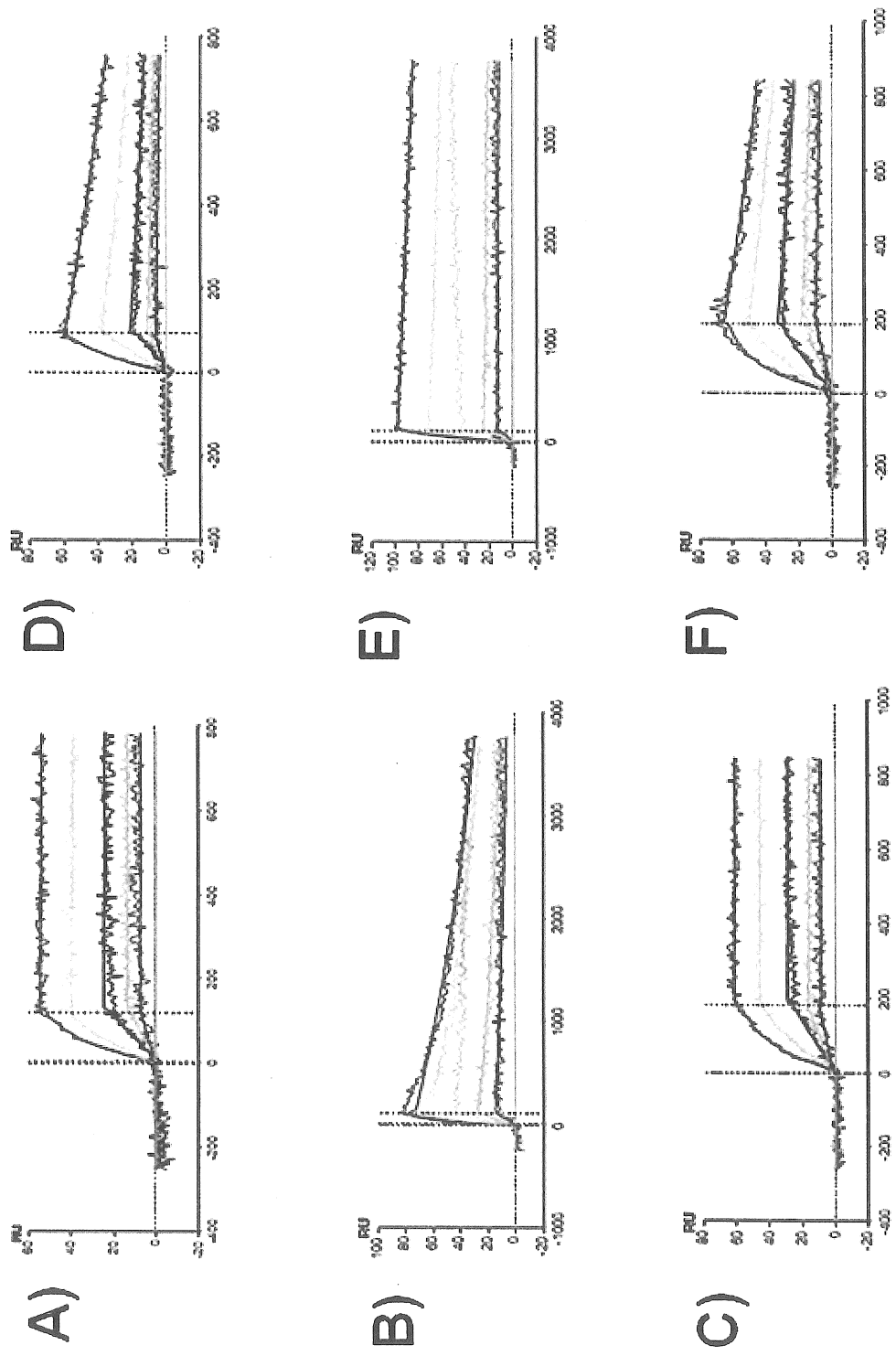
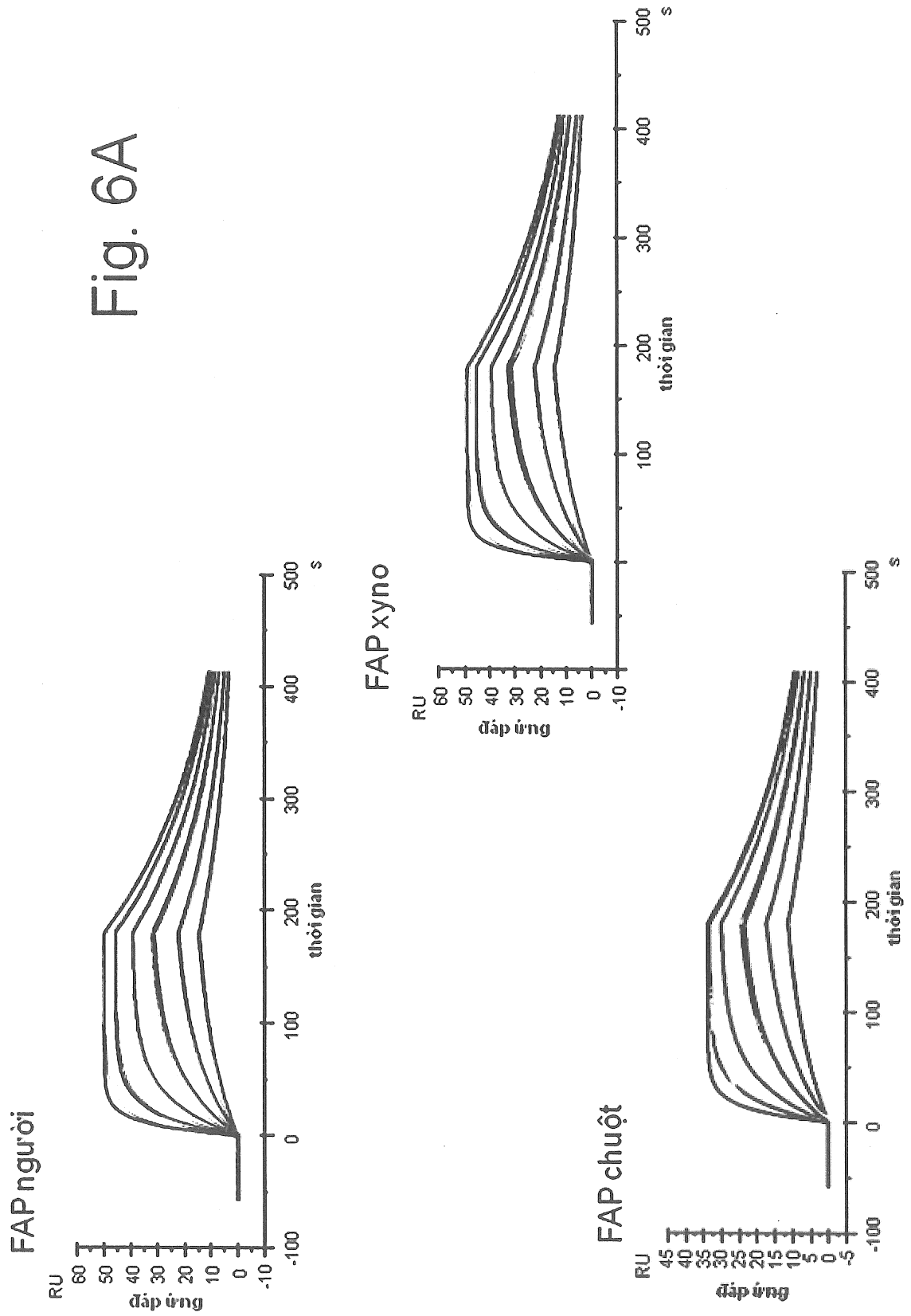
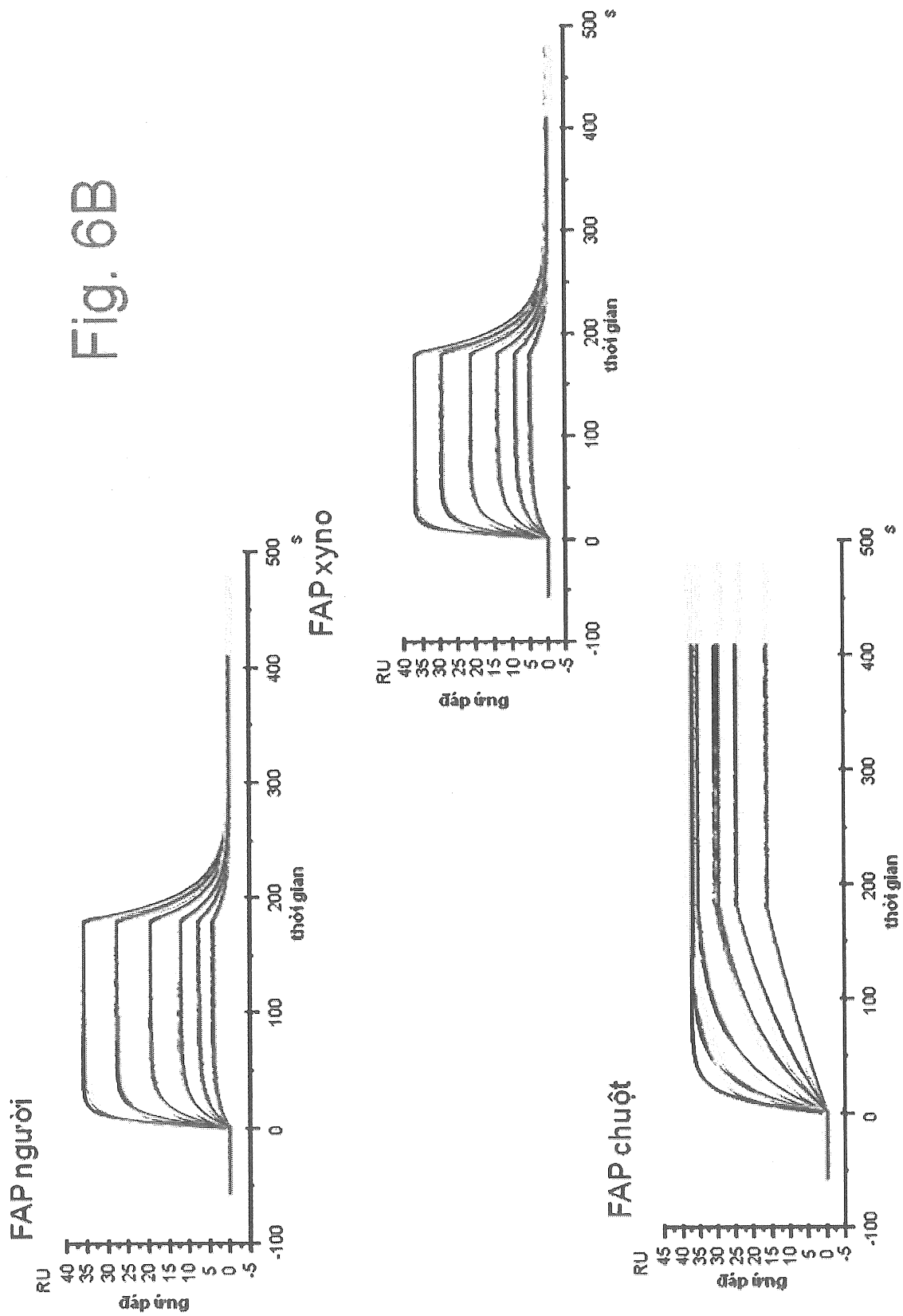


Fig. 6A





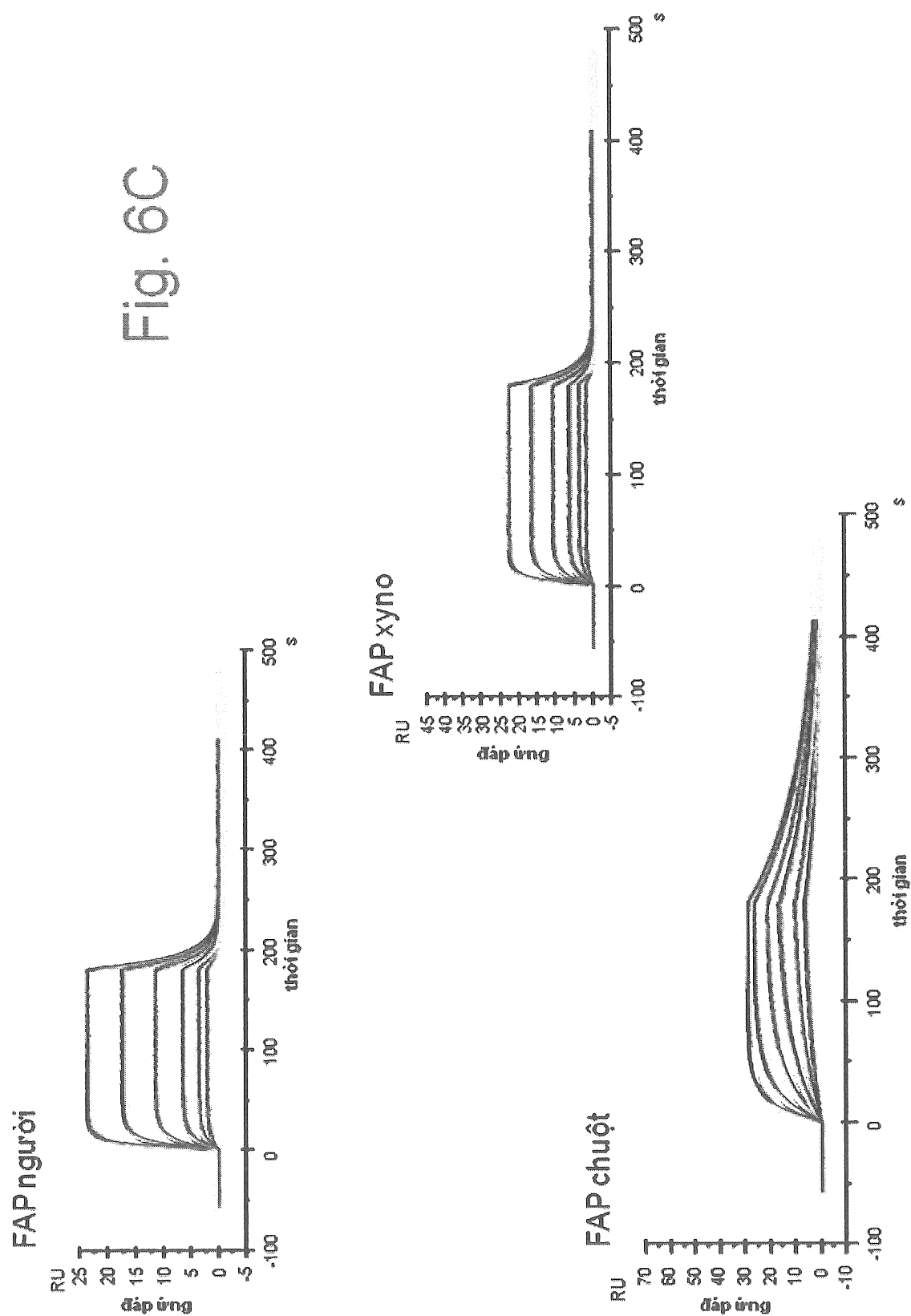
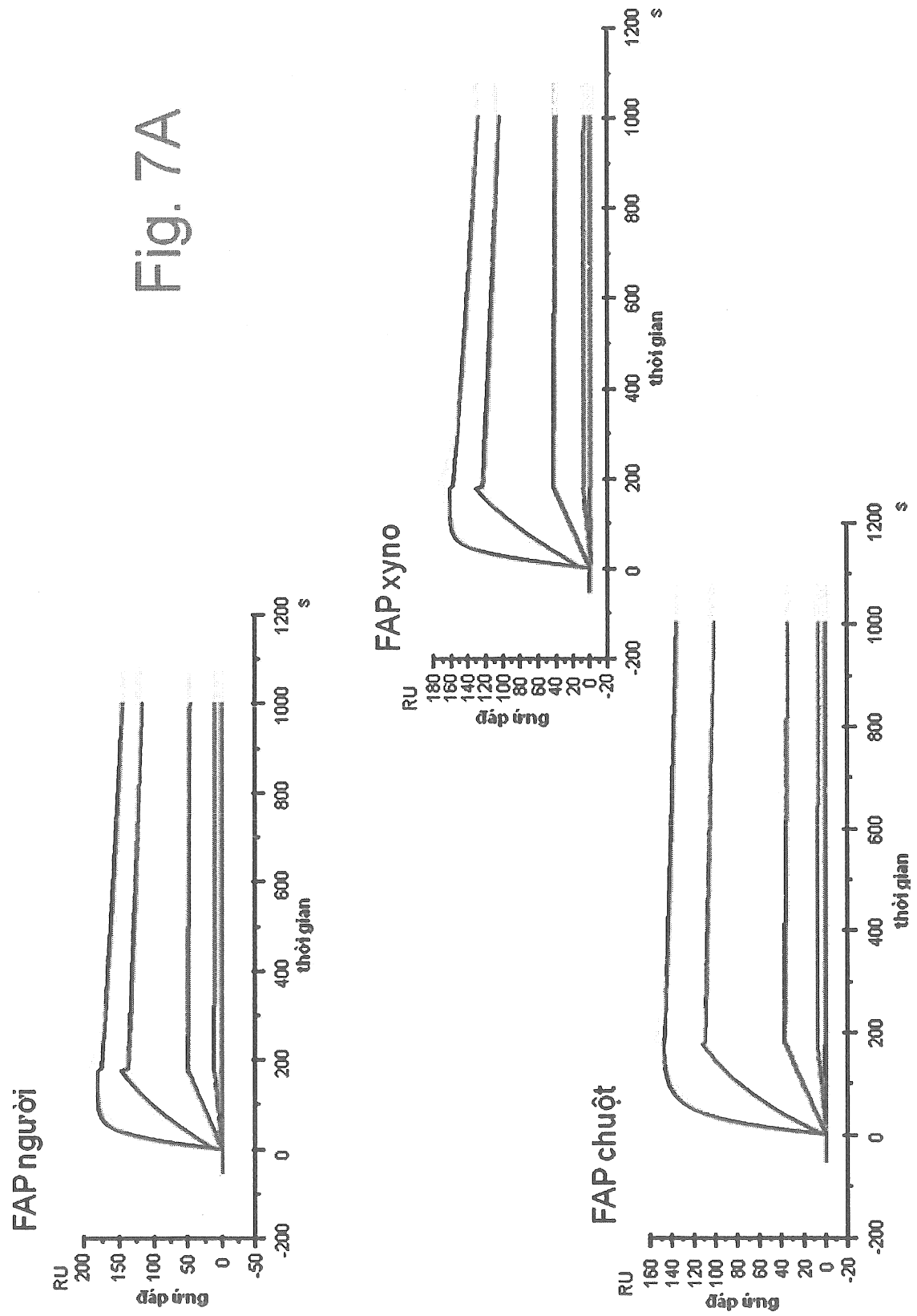


Fig. 6C



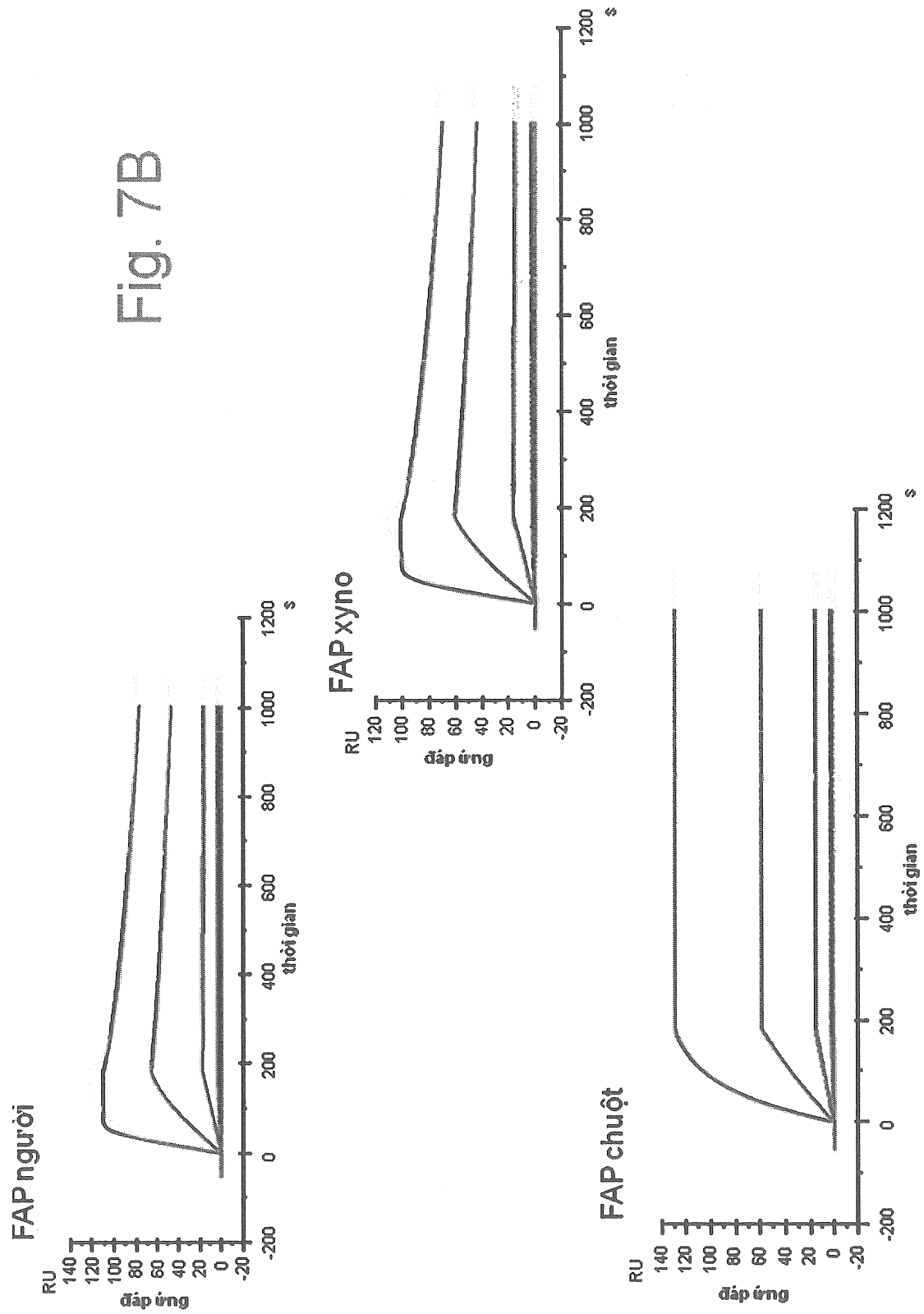


Fig. 7C

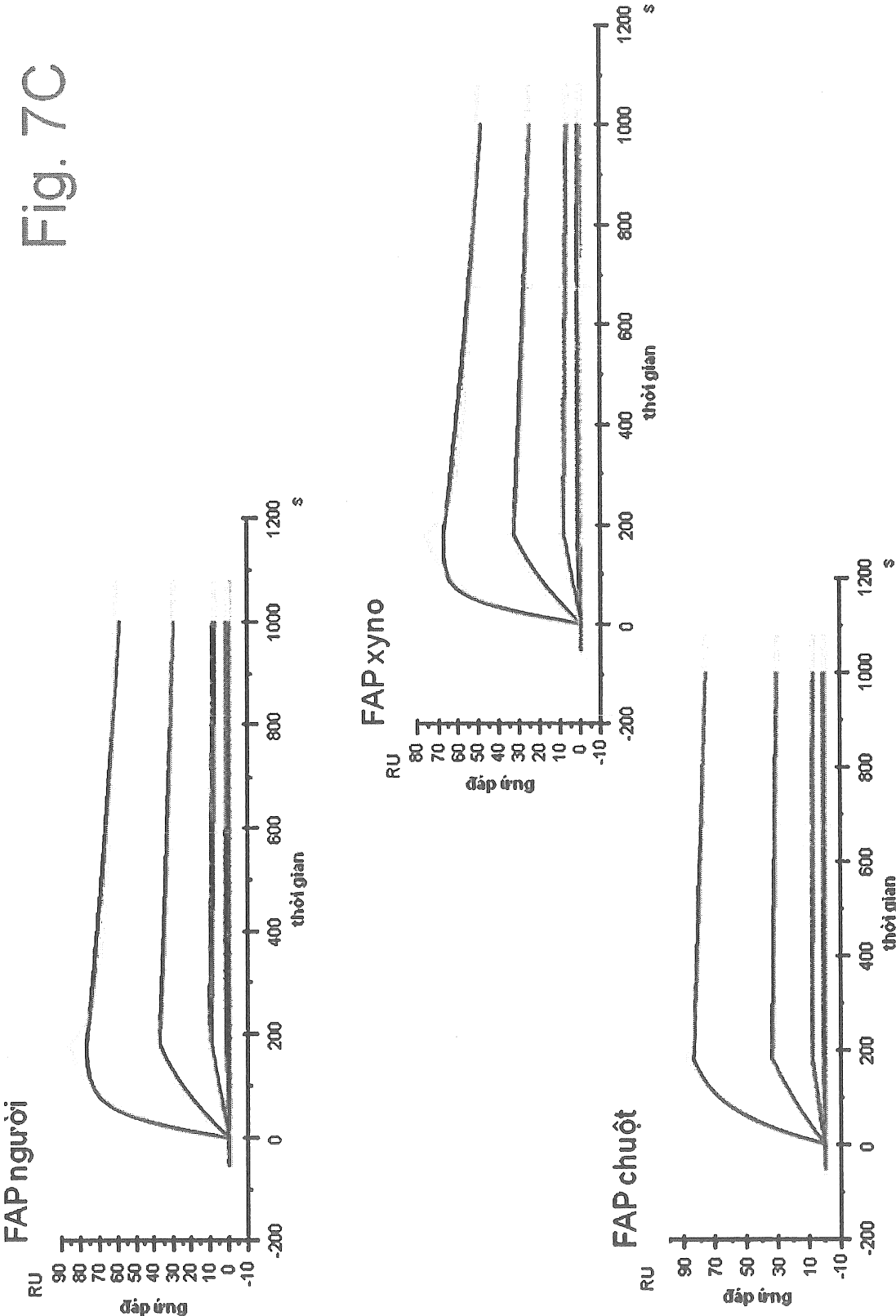


Fig. 8A

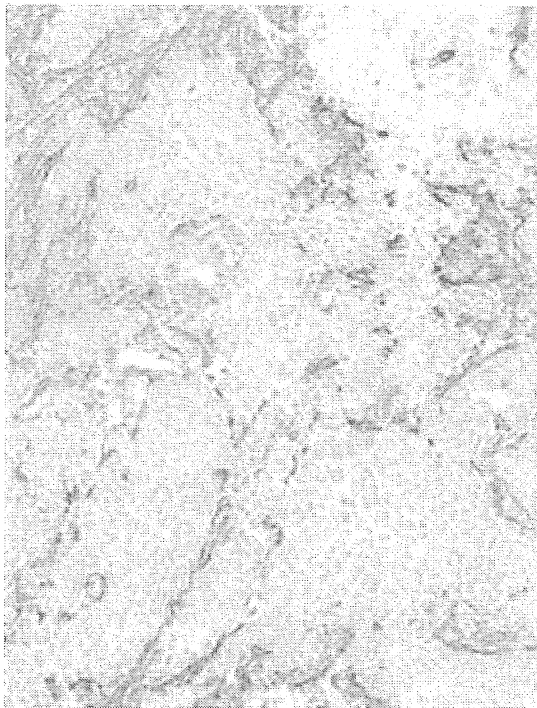
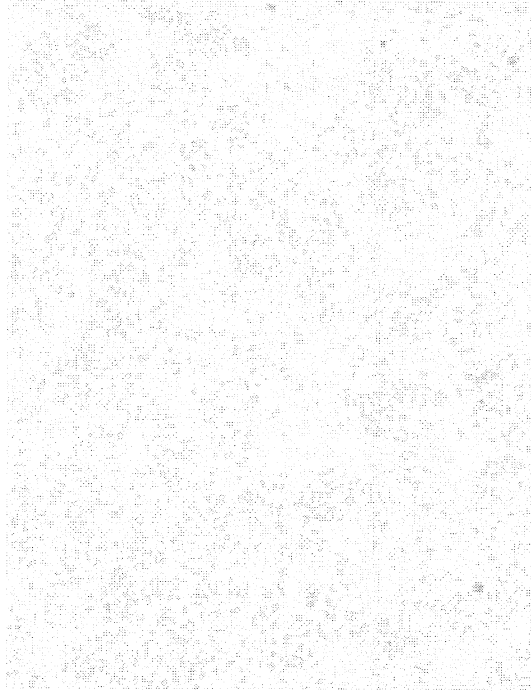
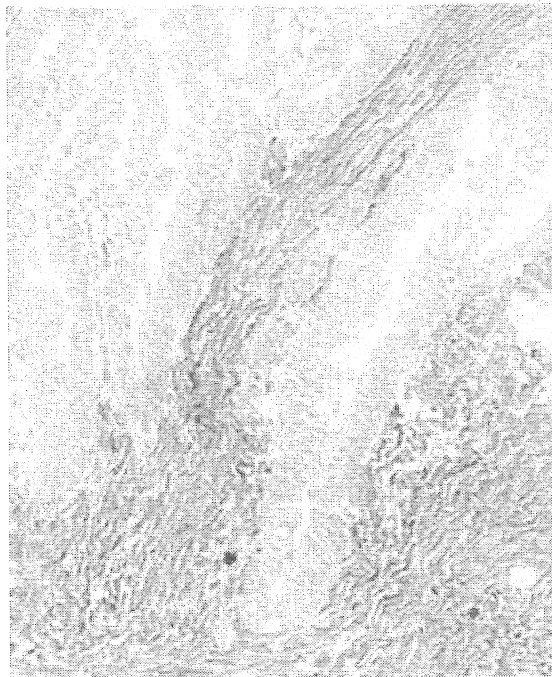


Fig. 8B



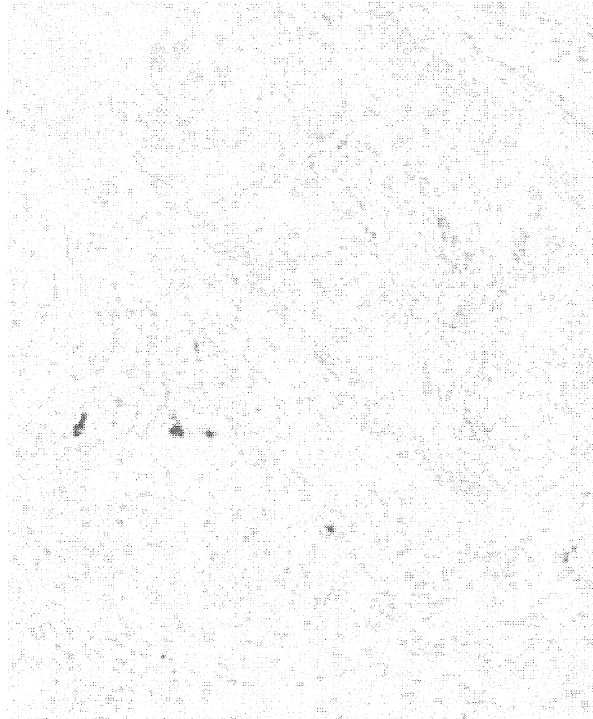


Fig. 8C

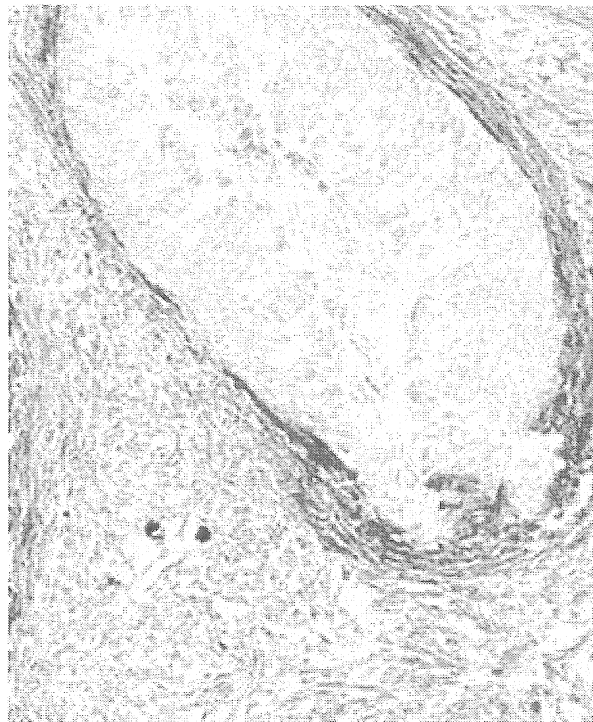
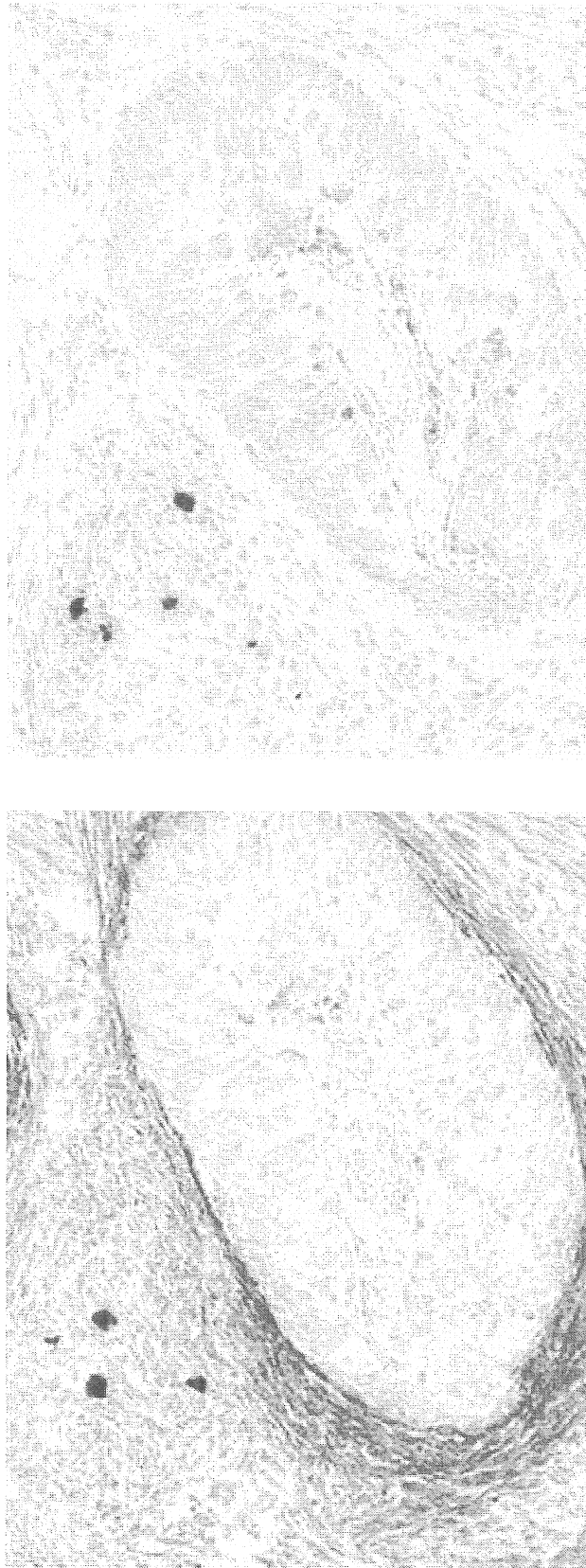


Fig. 8D



A

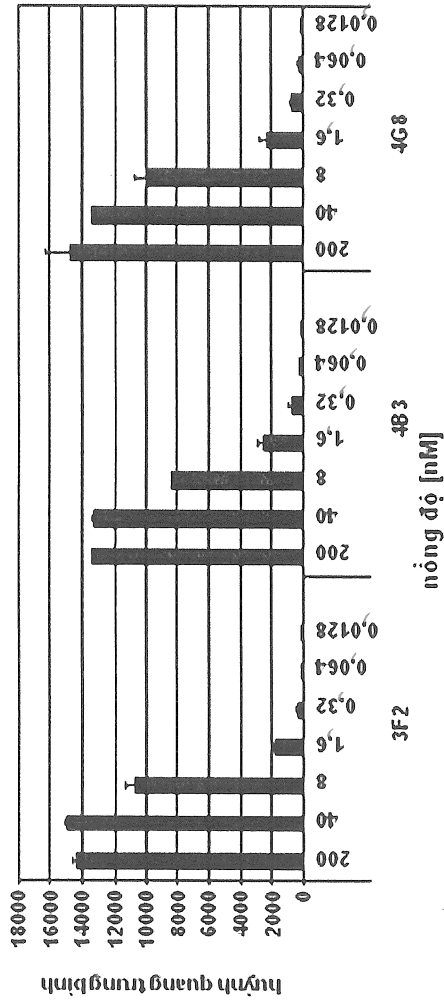


Fig. 9

B

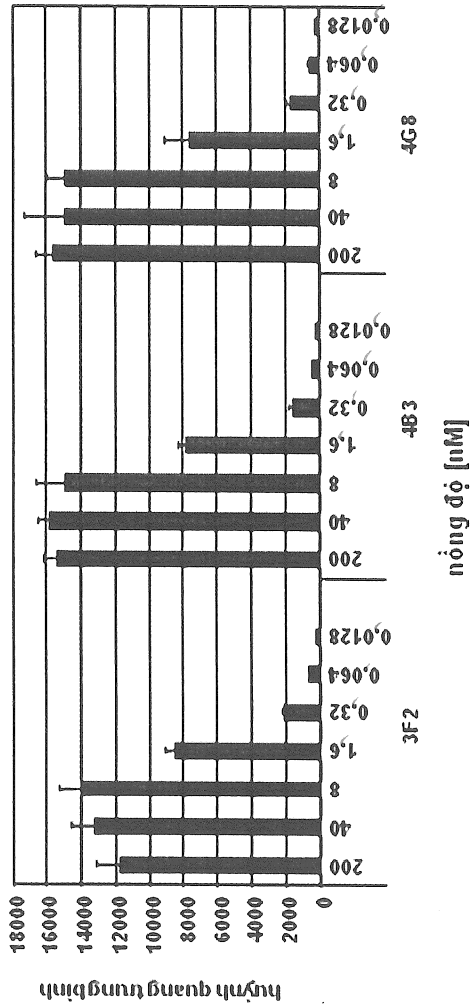


Fig. 10

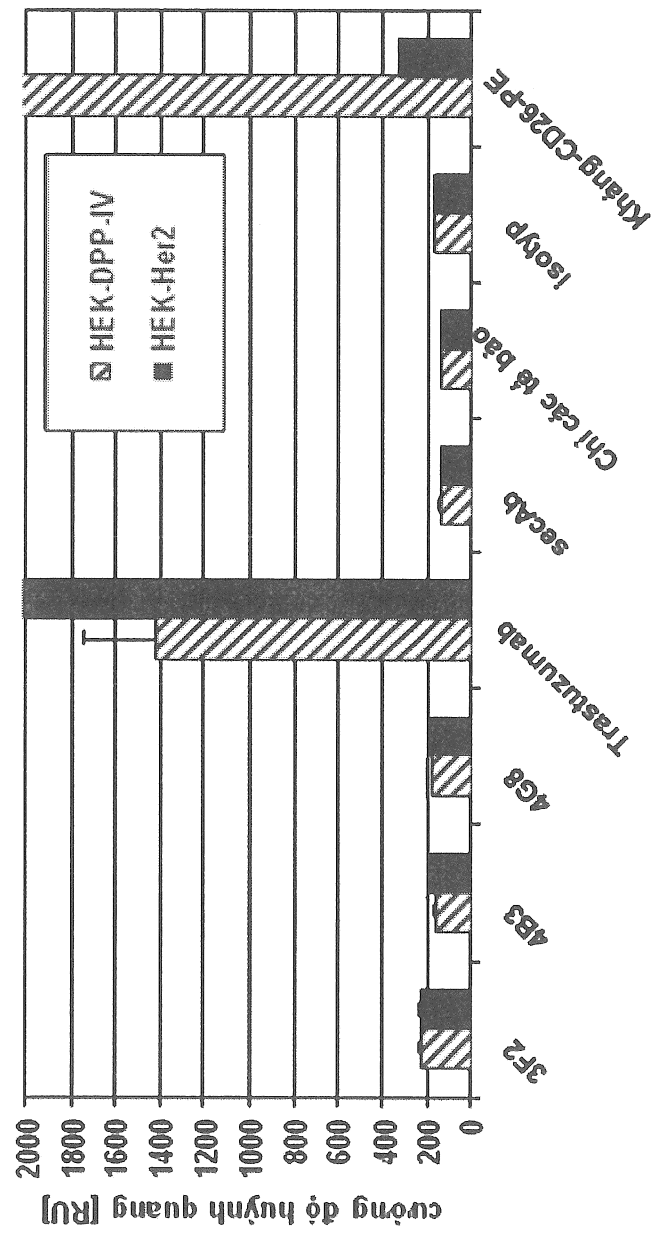


Fig. 11

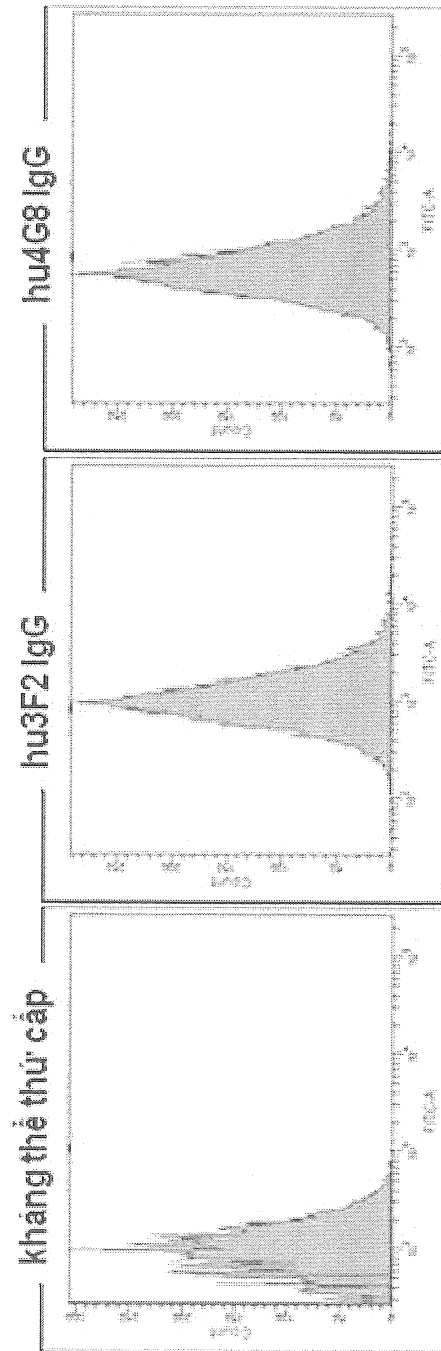
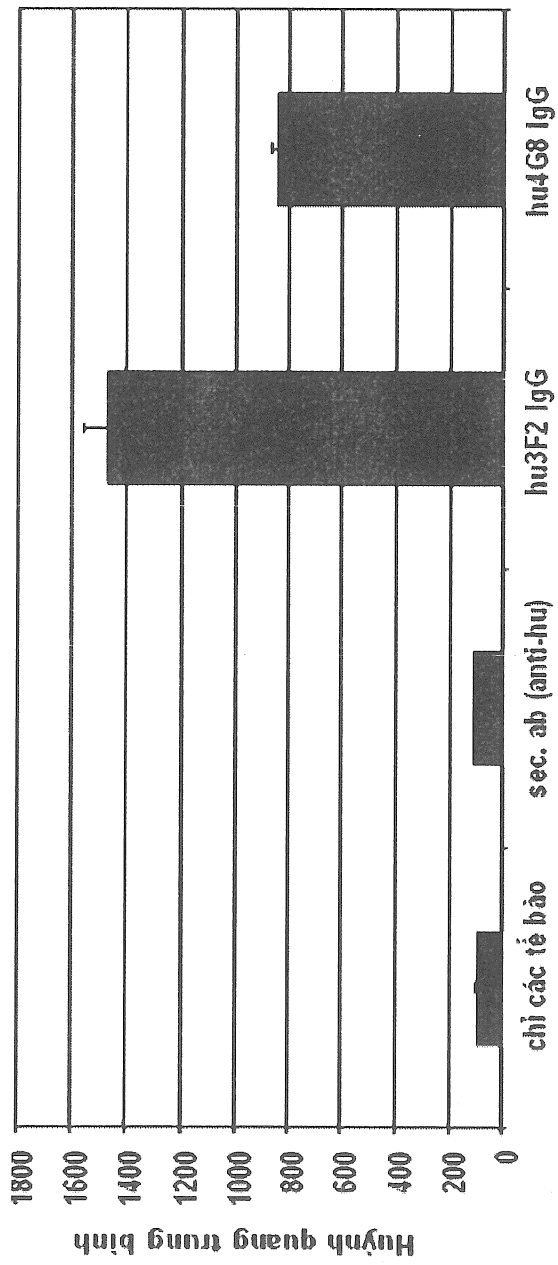


Fig. 12

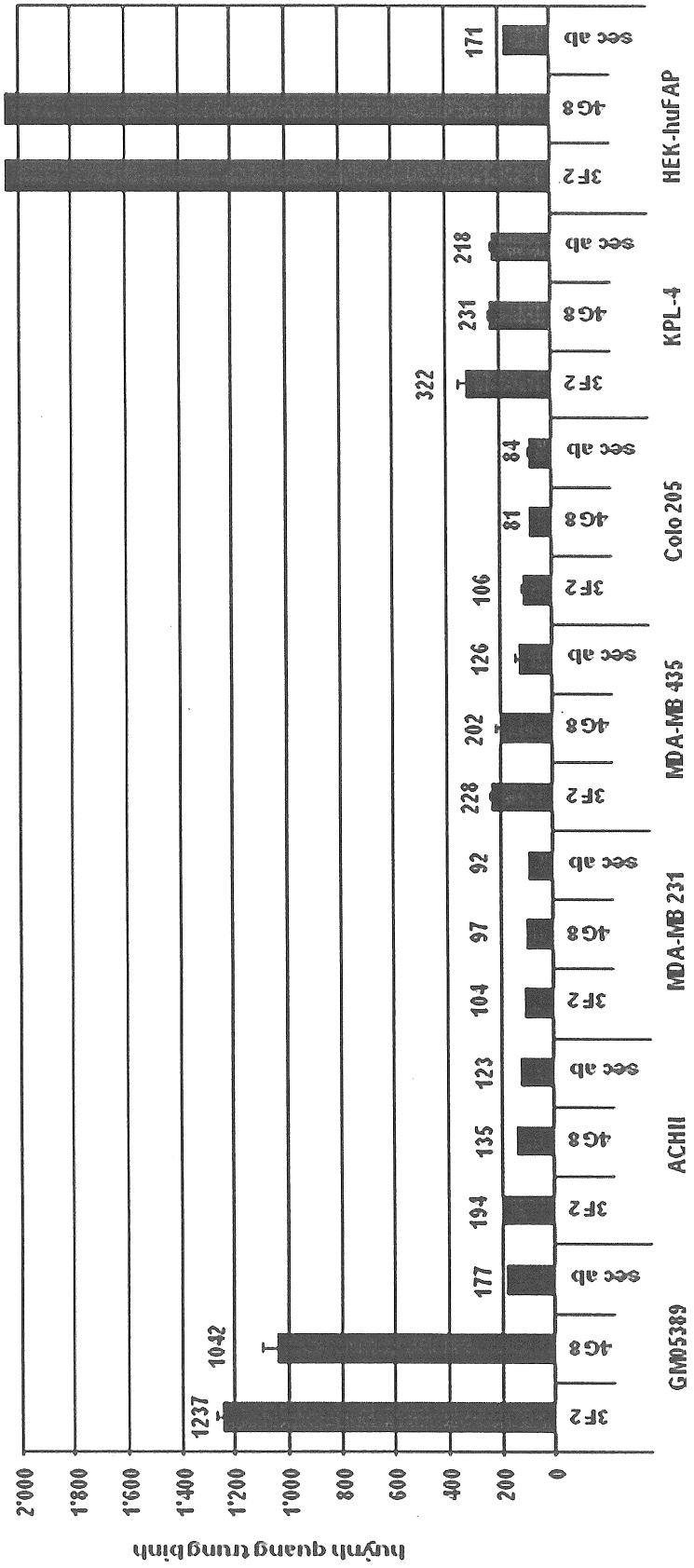


Fig. 13A

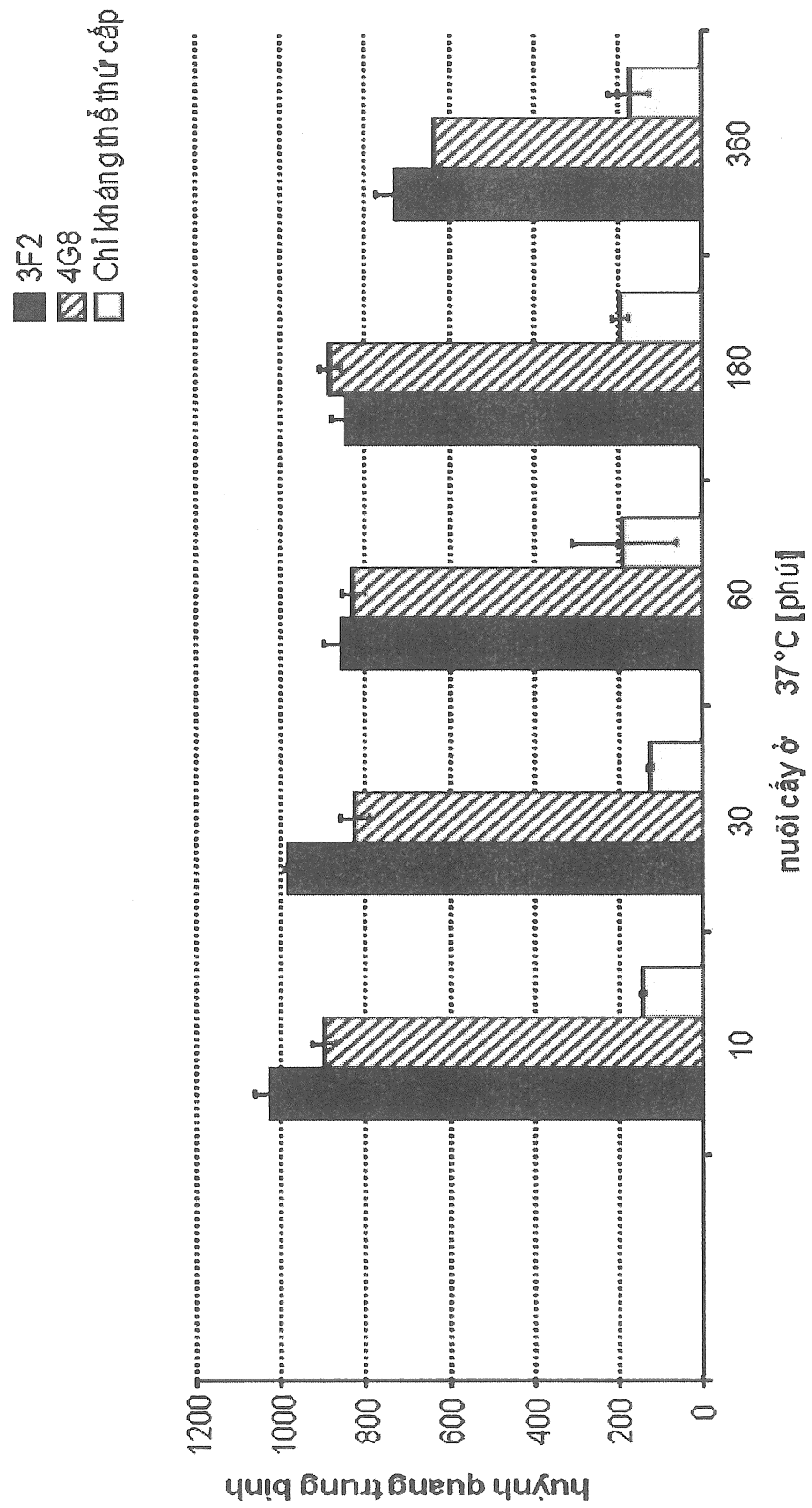


Fig. 13B

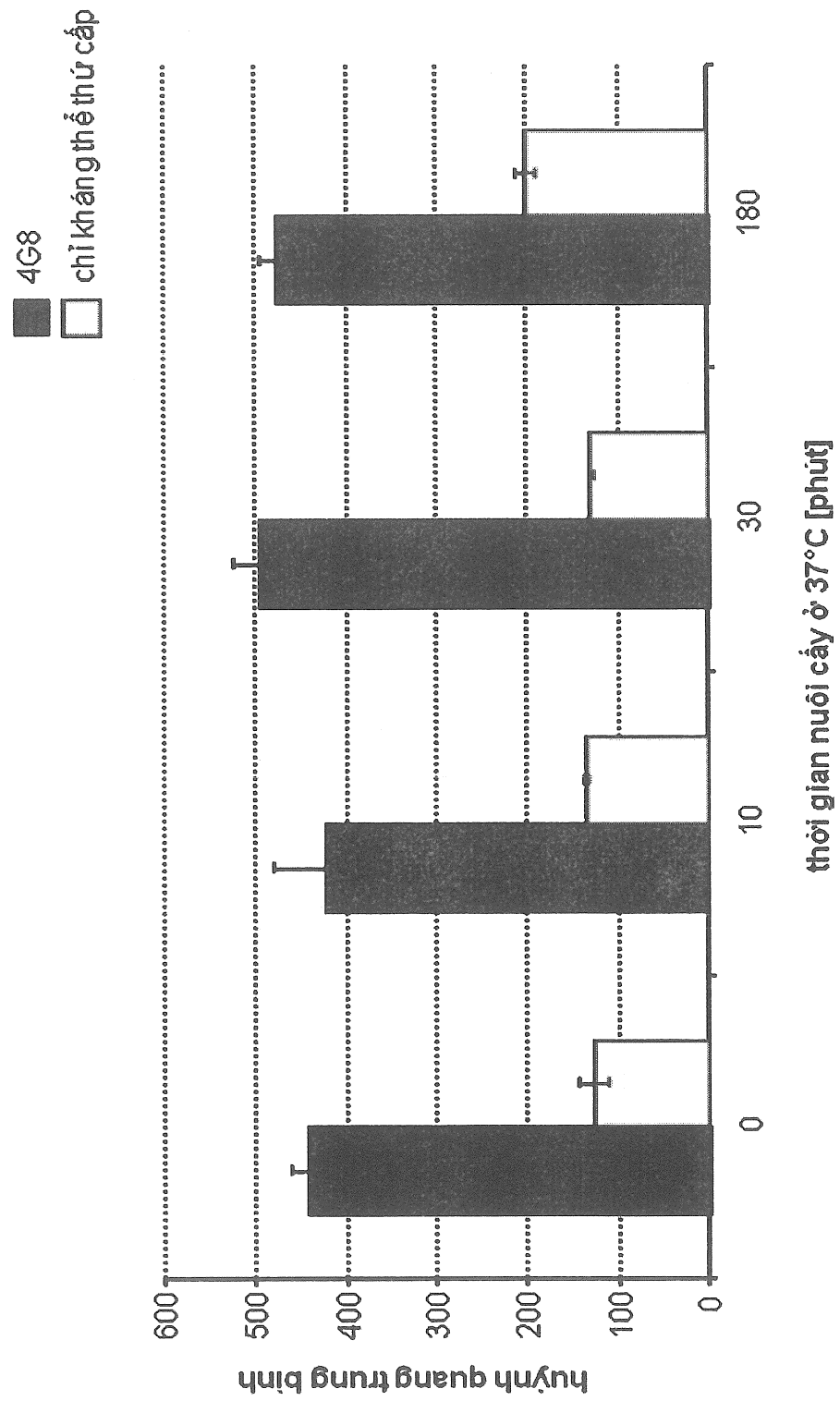


Fig. 14A

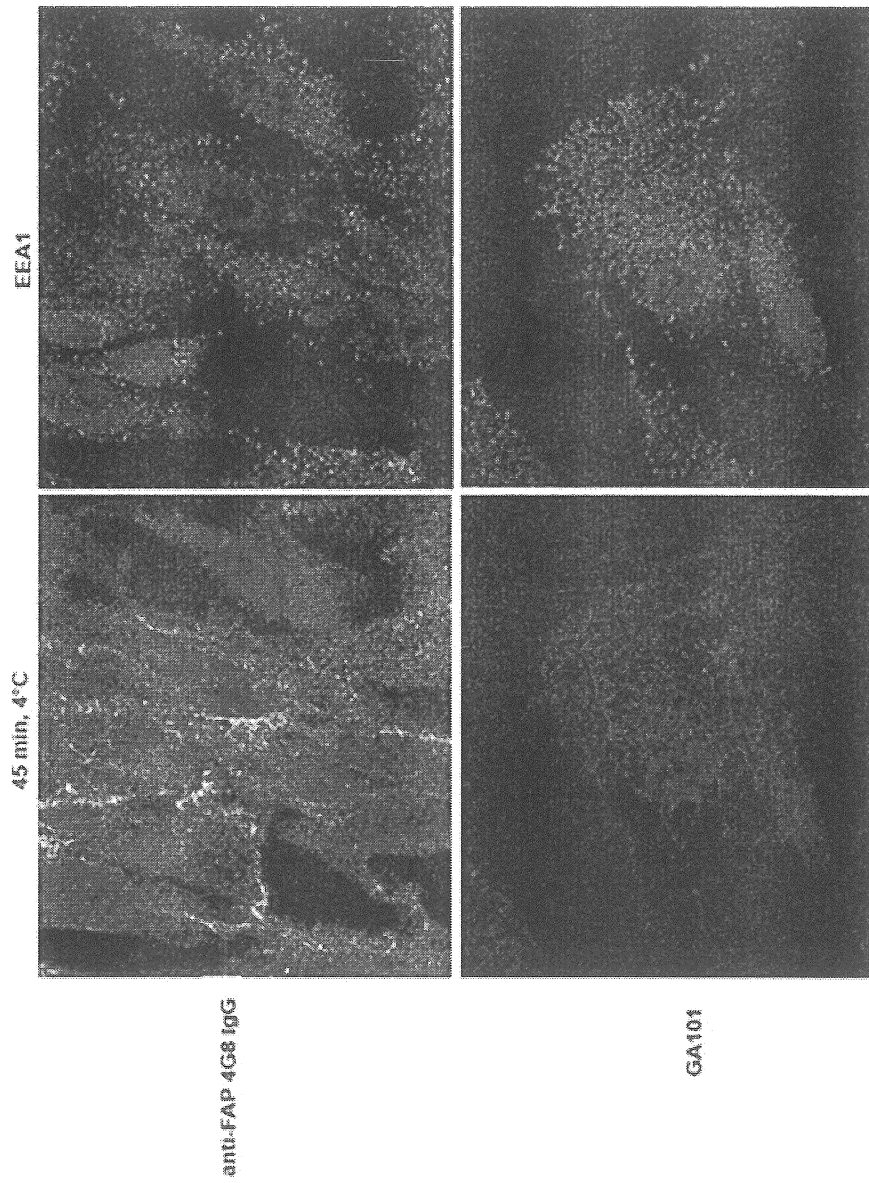


Fig. 14B

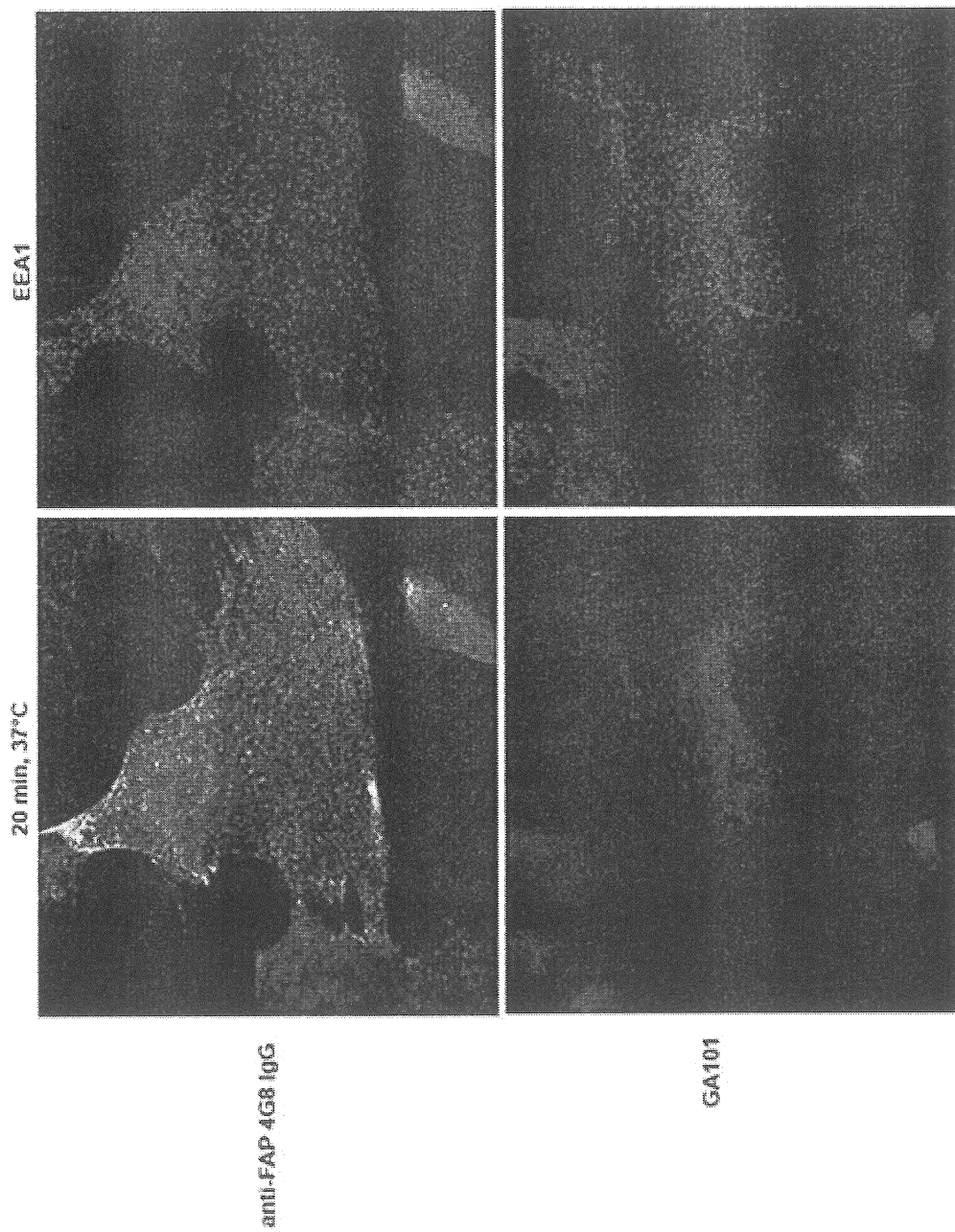


Fig. 14C

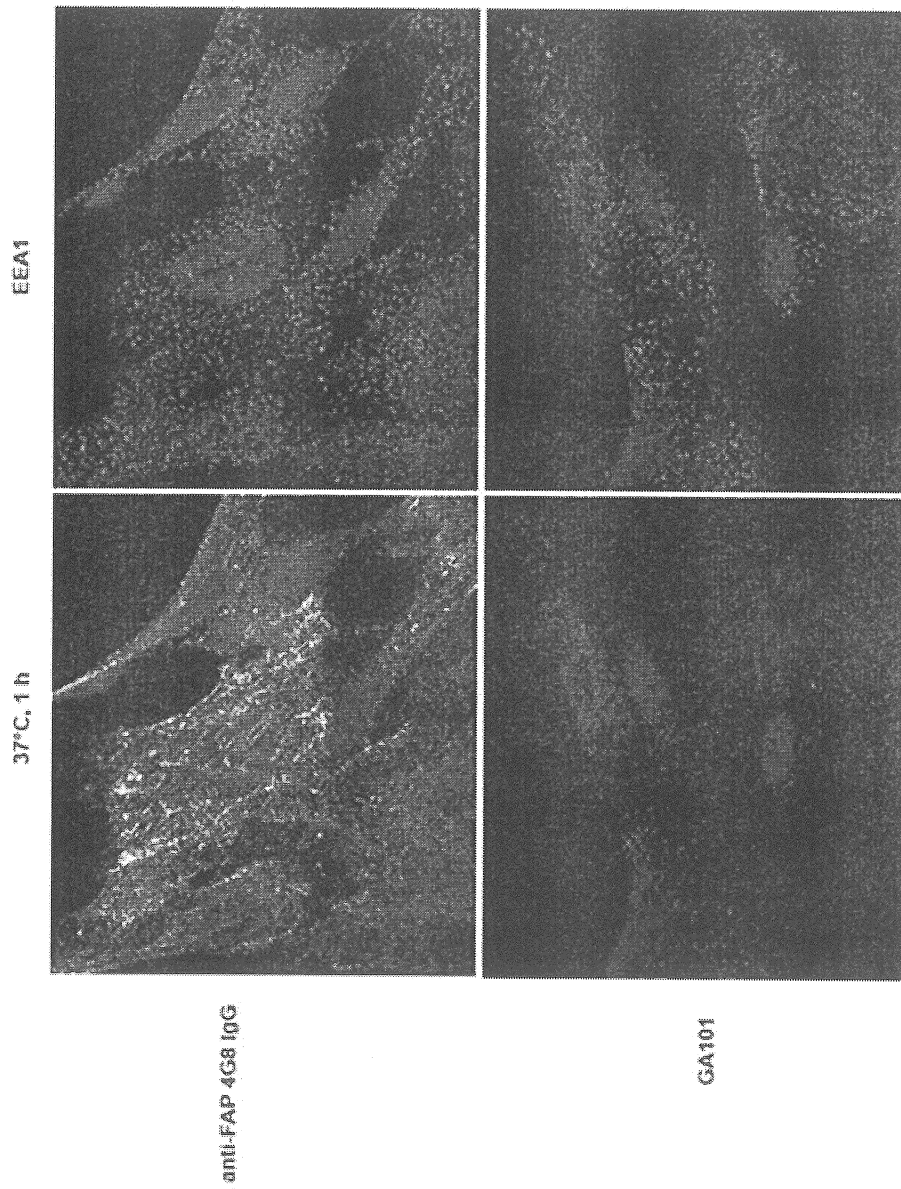
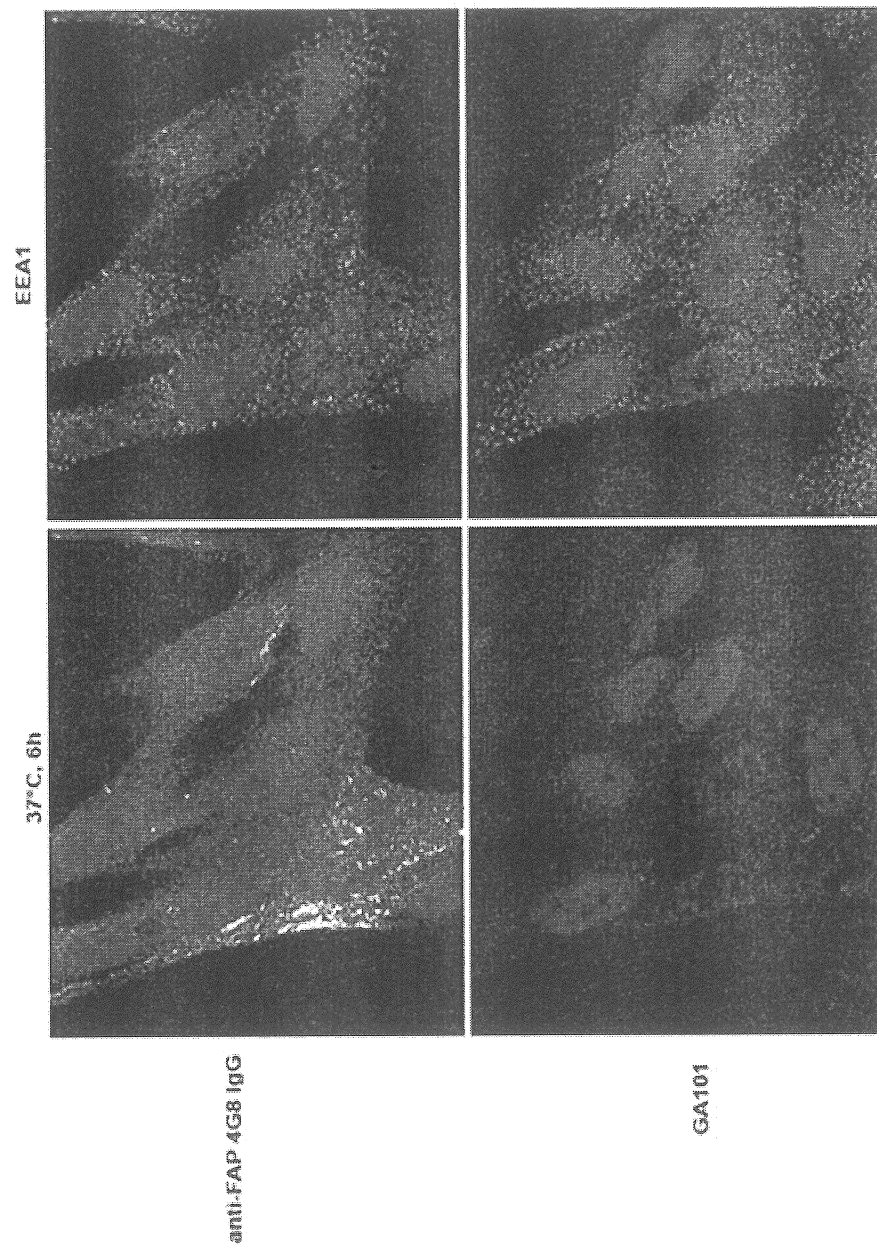
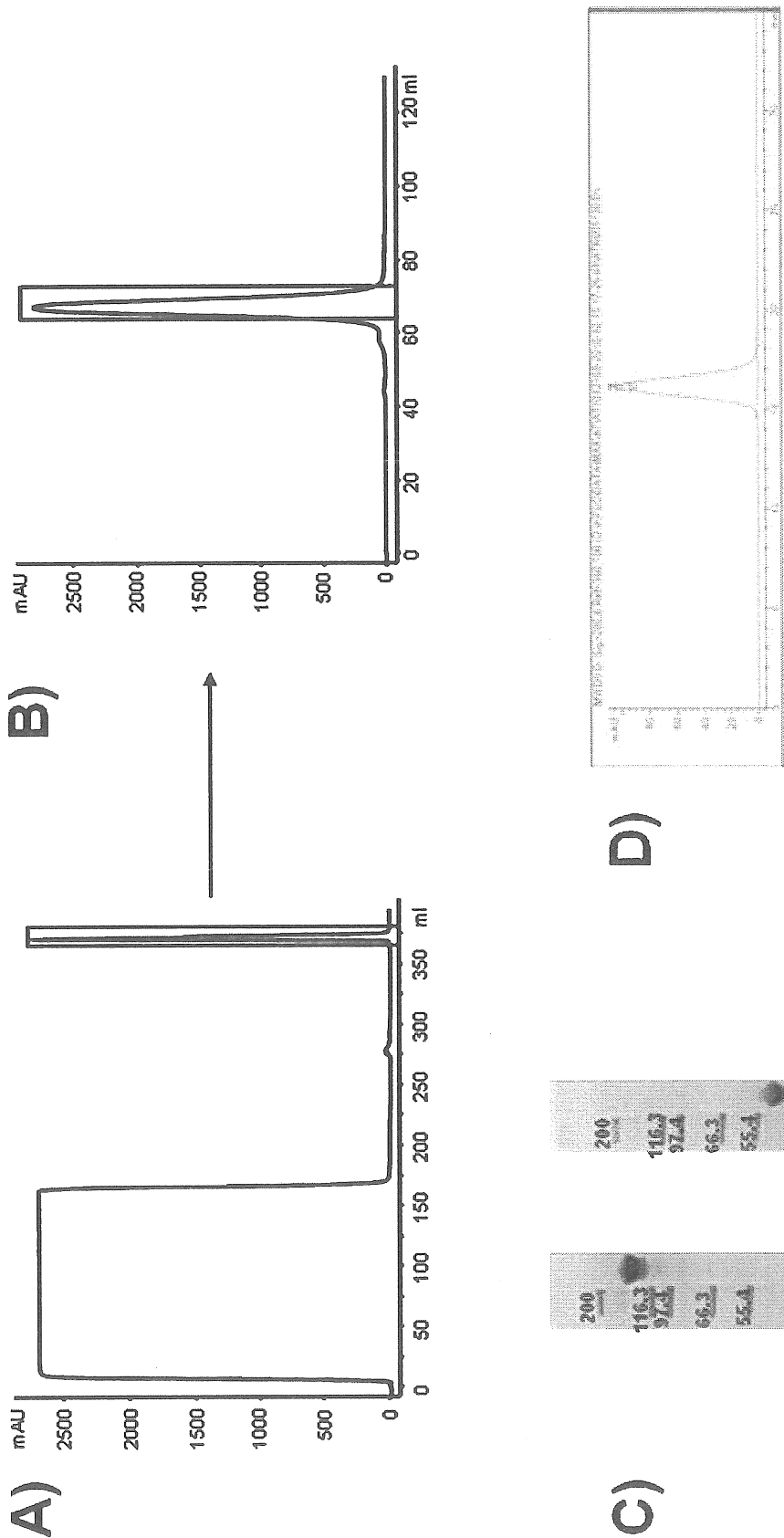


Fig. 14D





không được khử được khử

Fig. 15

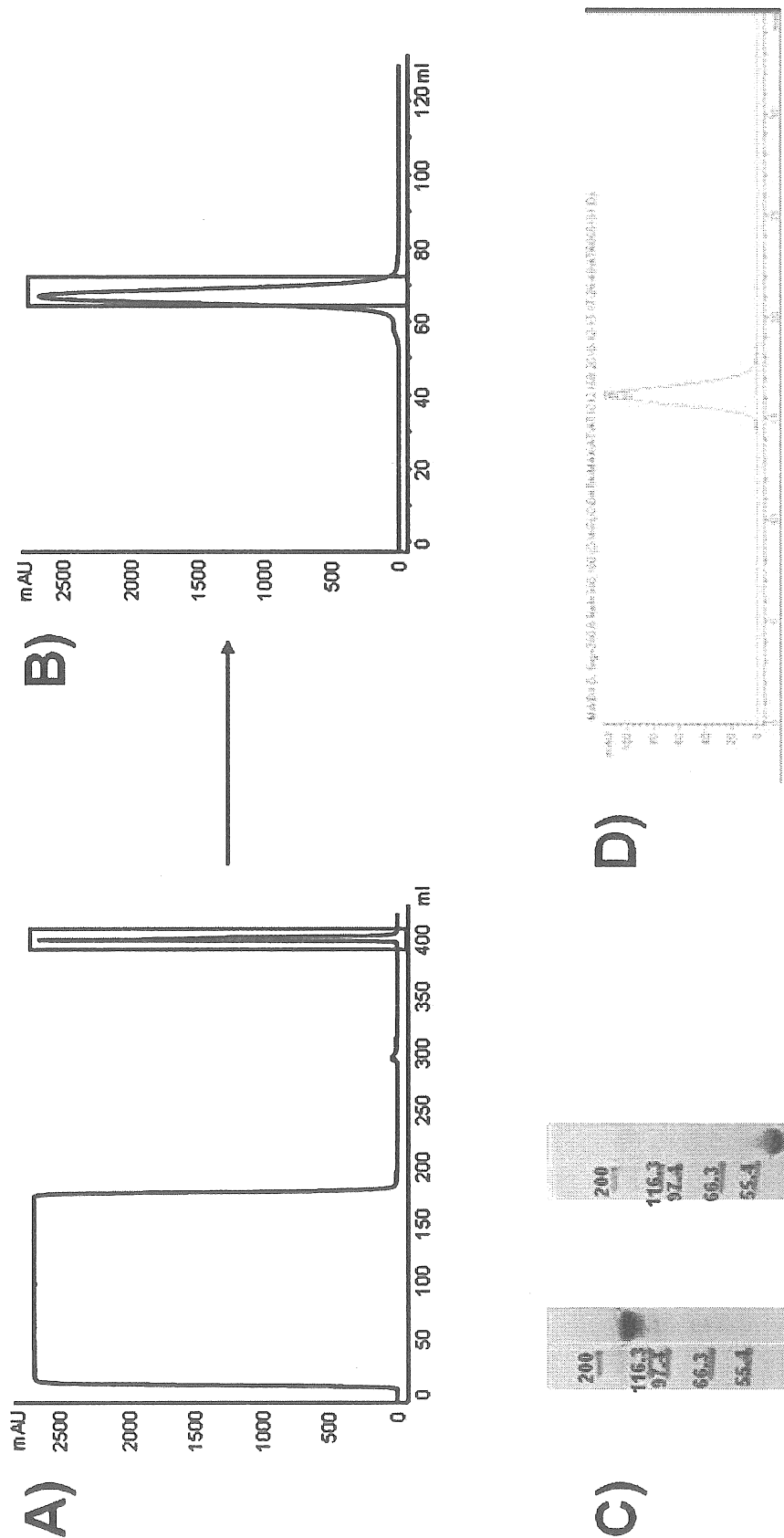


Fig. 16

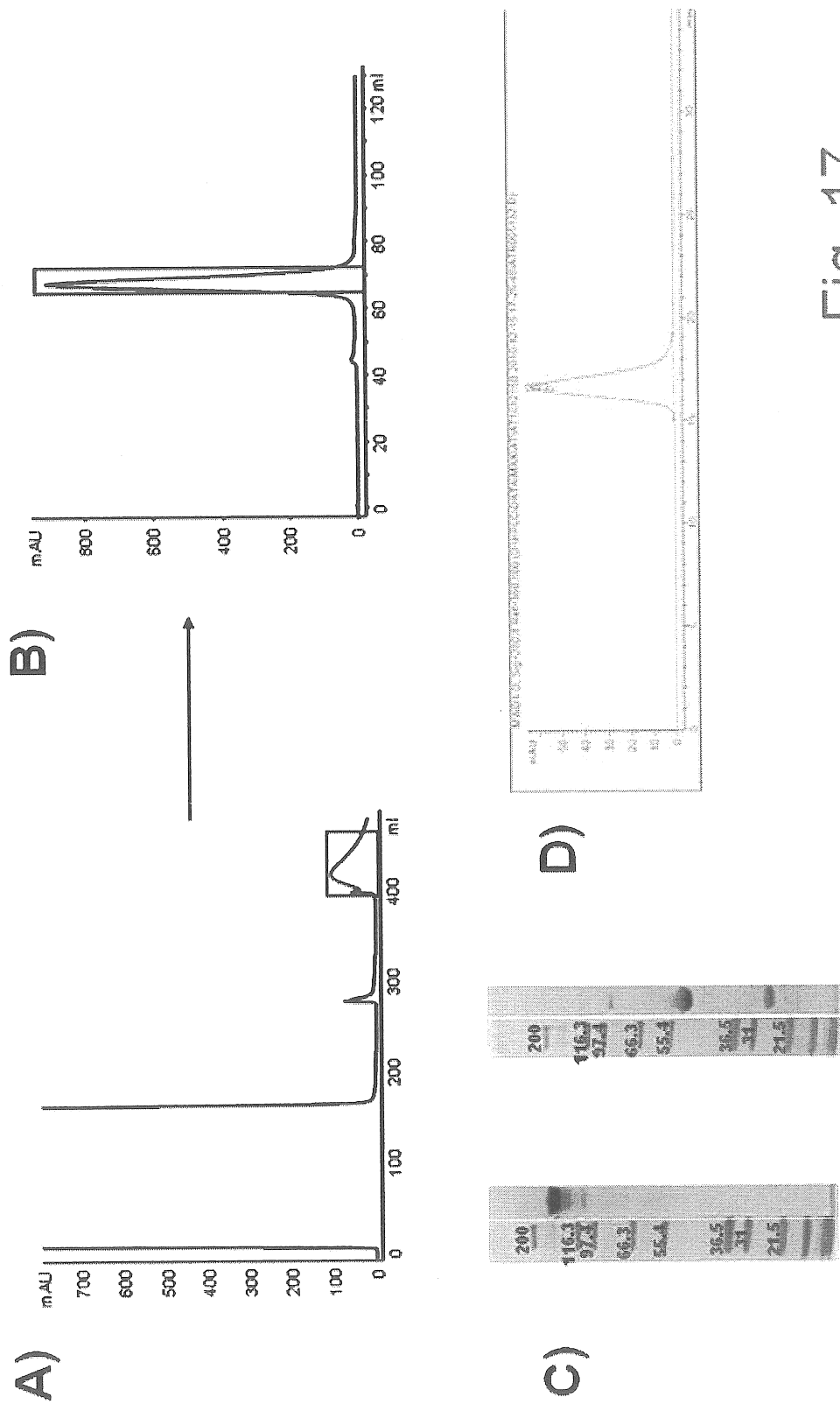


Fig. 17

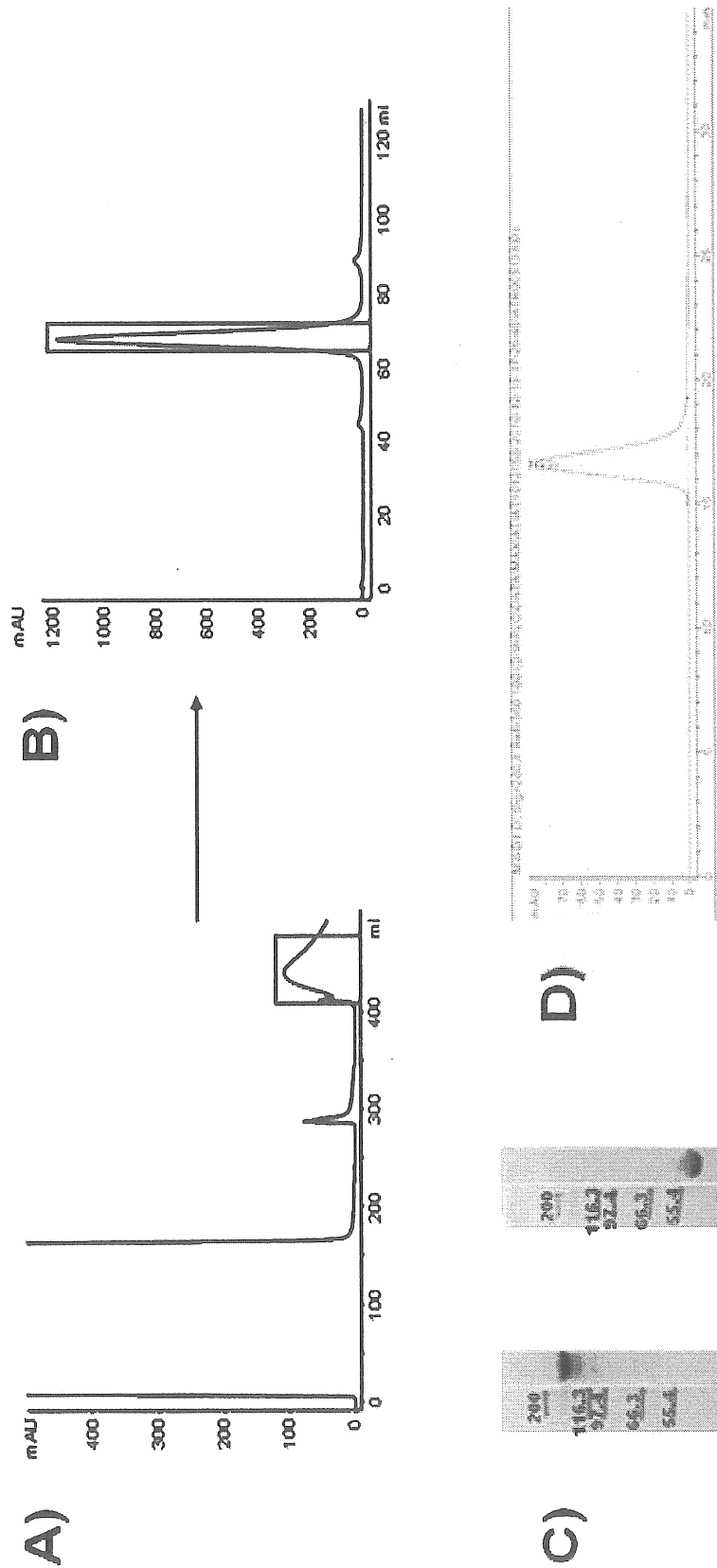
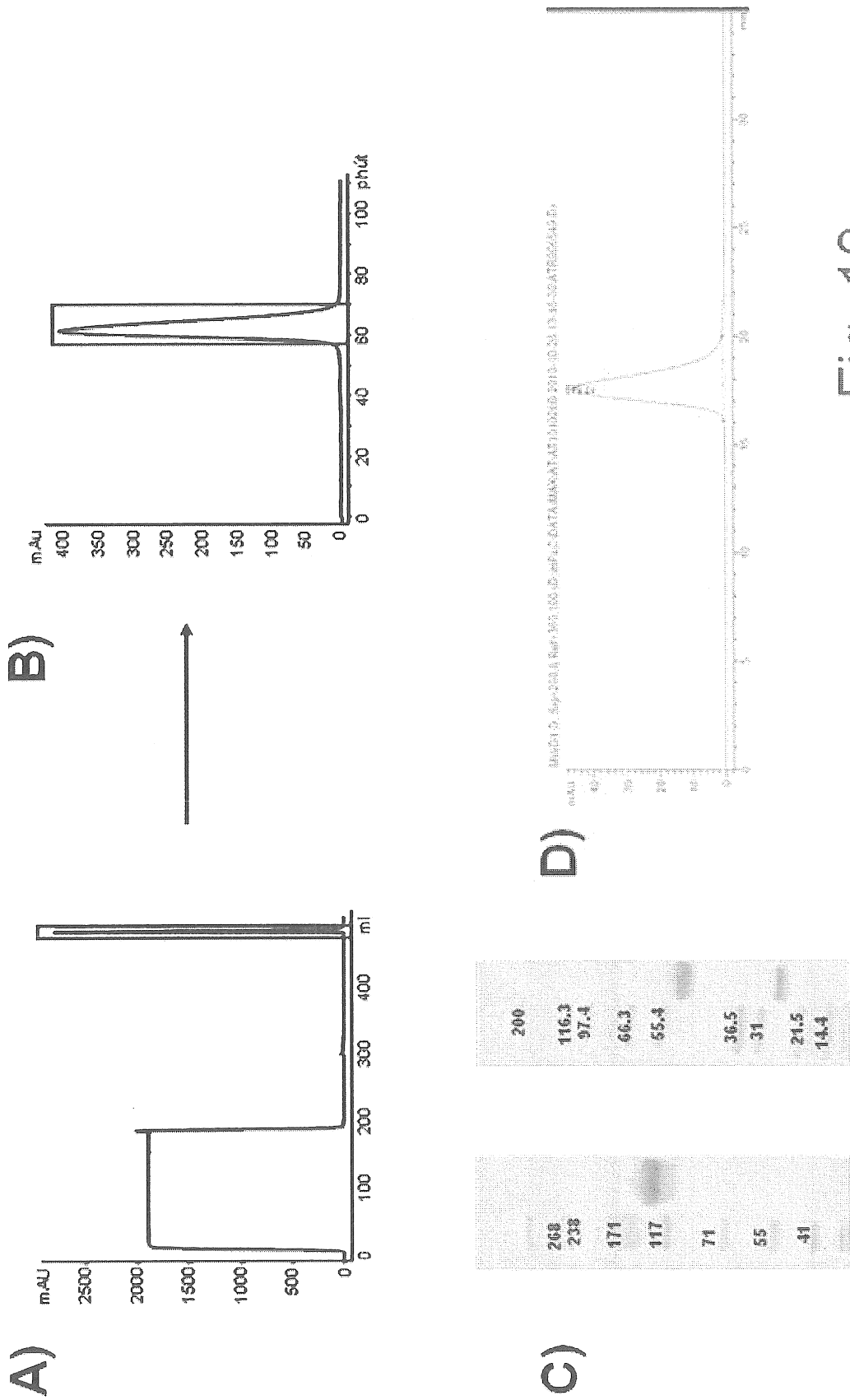


Fig. 18



không được khử được khử

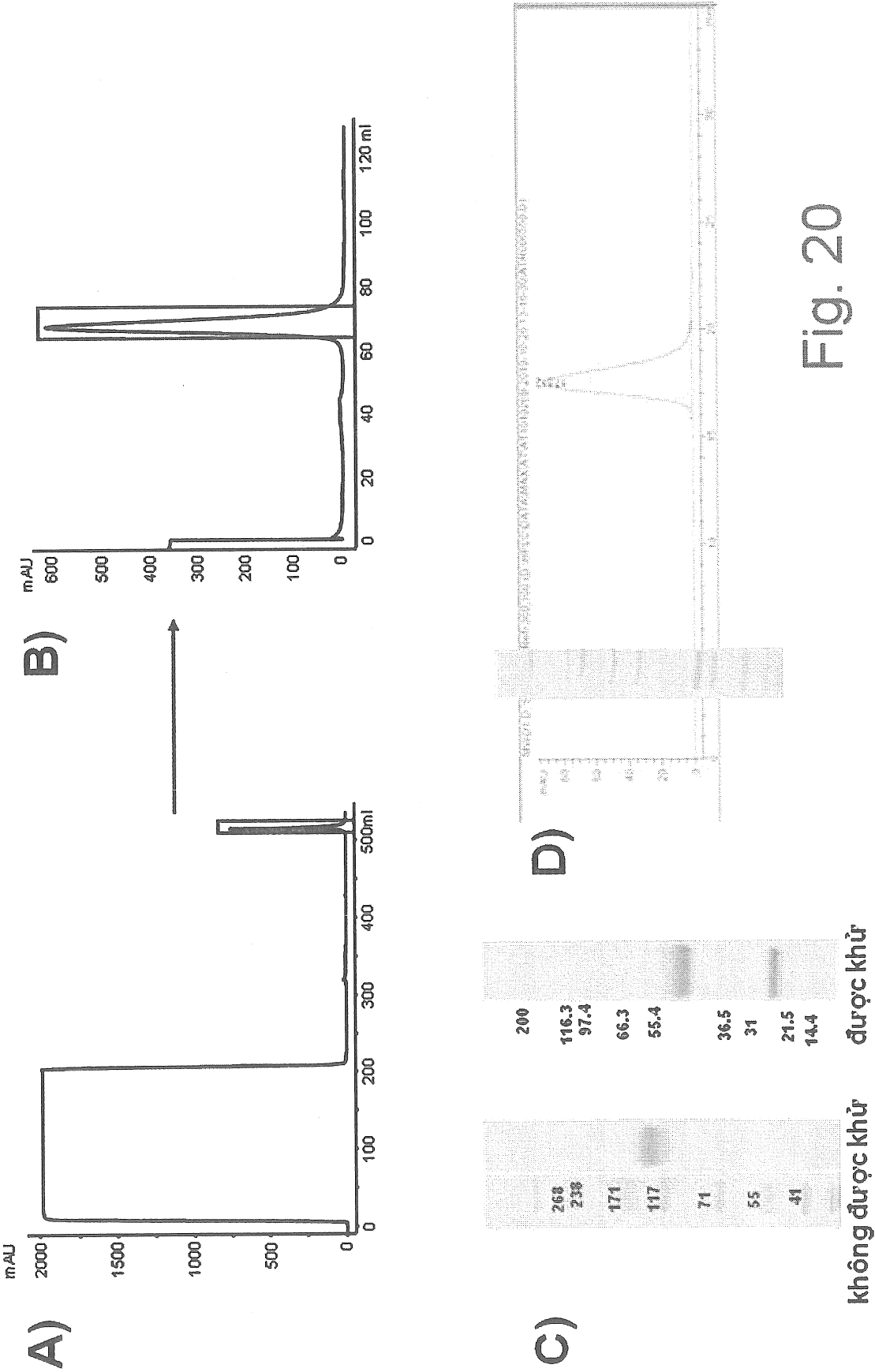


Fig. 20

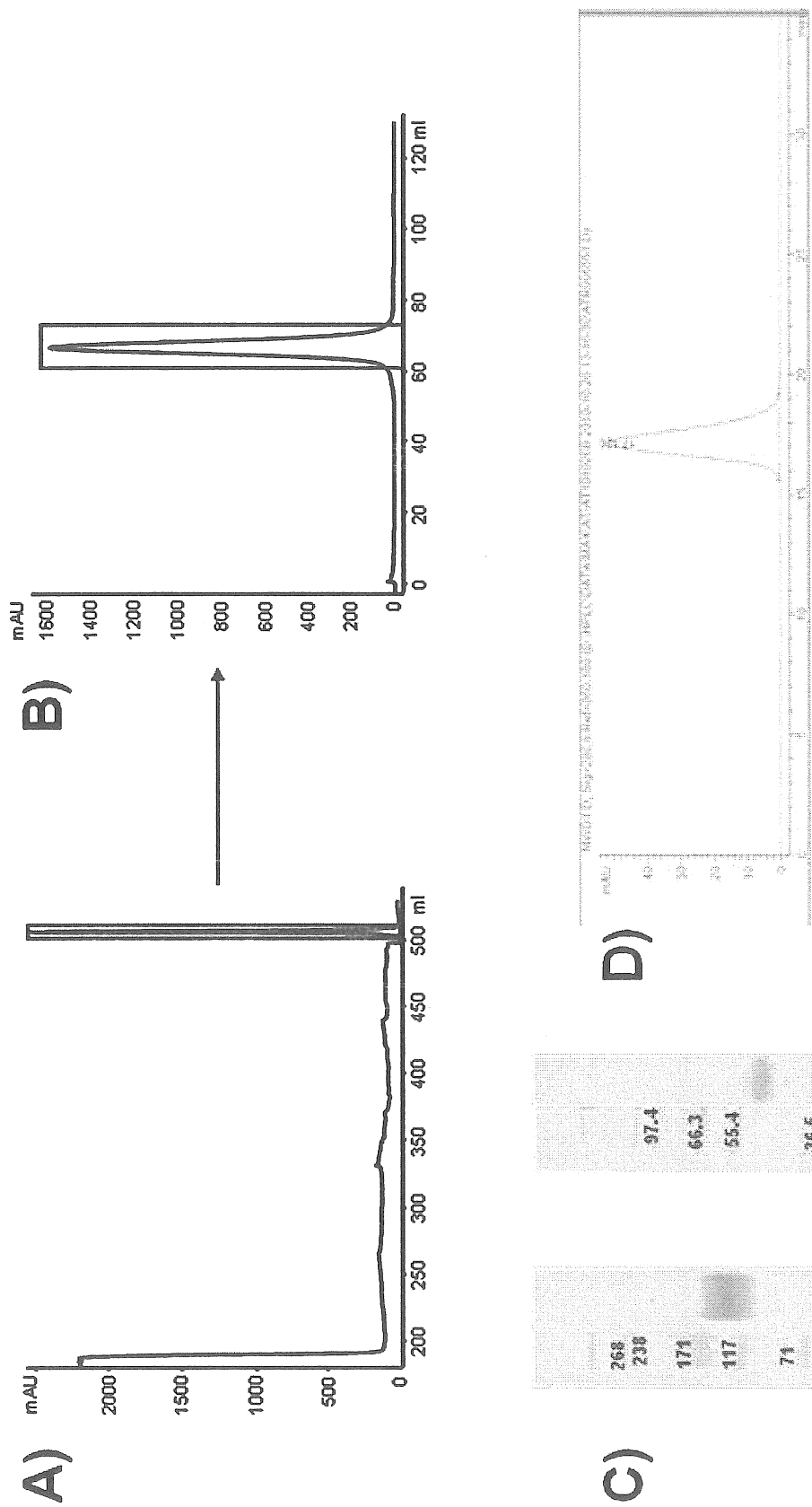


Fig. 21

không được khử được khử

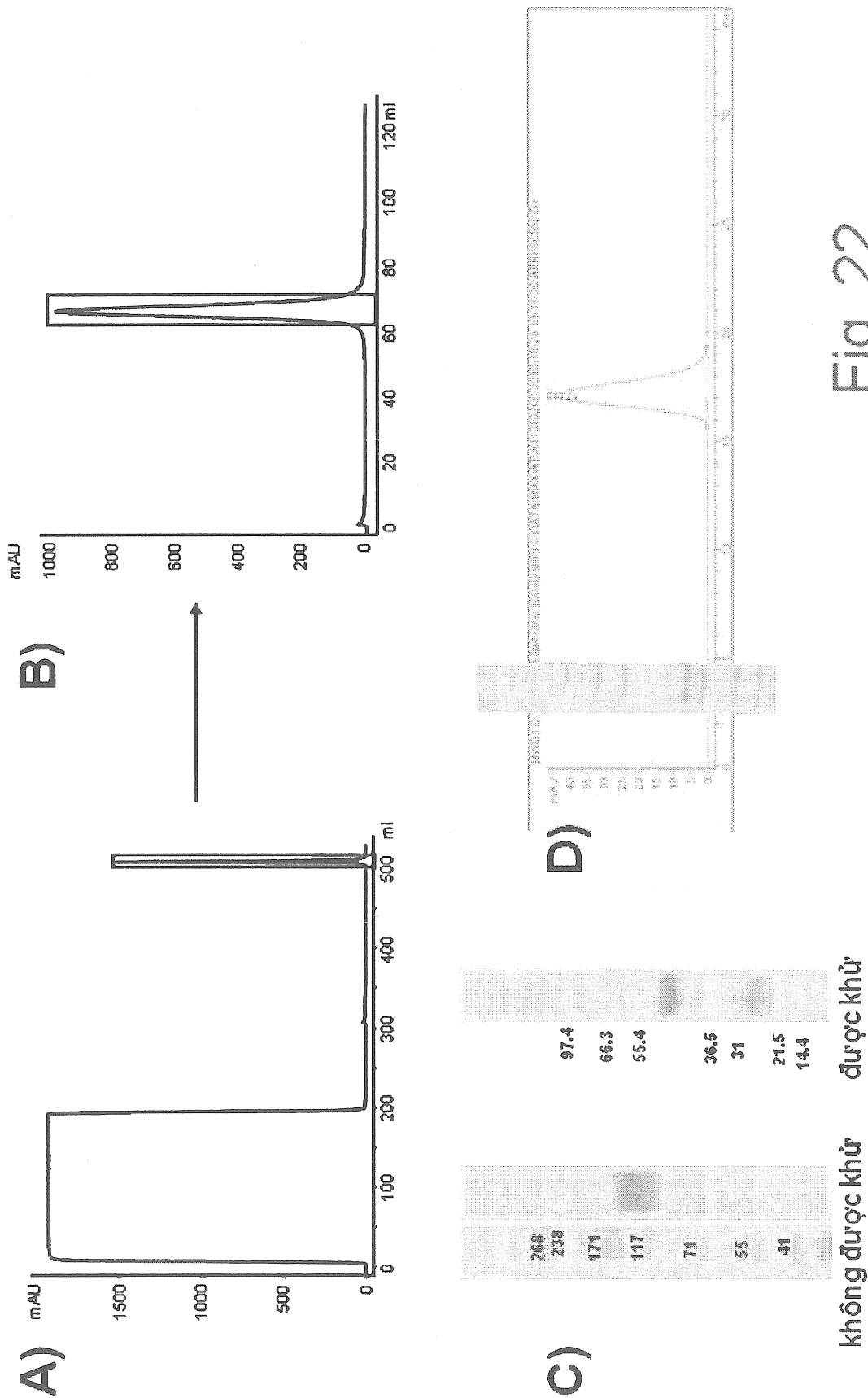


Fig. 22

Fig. 23

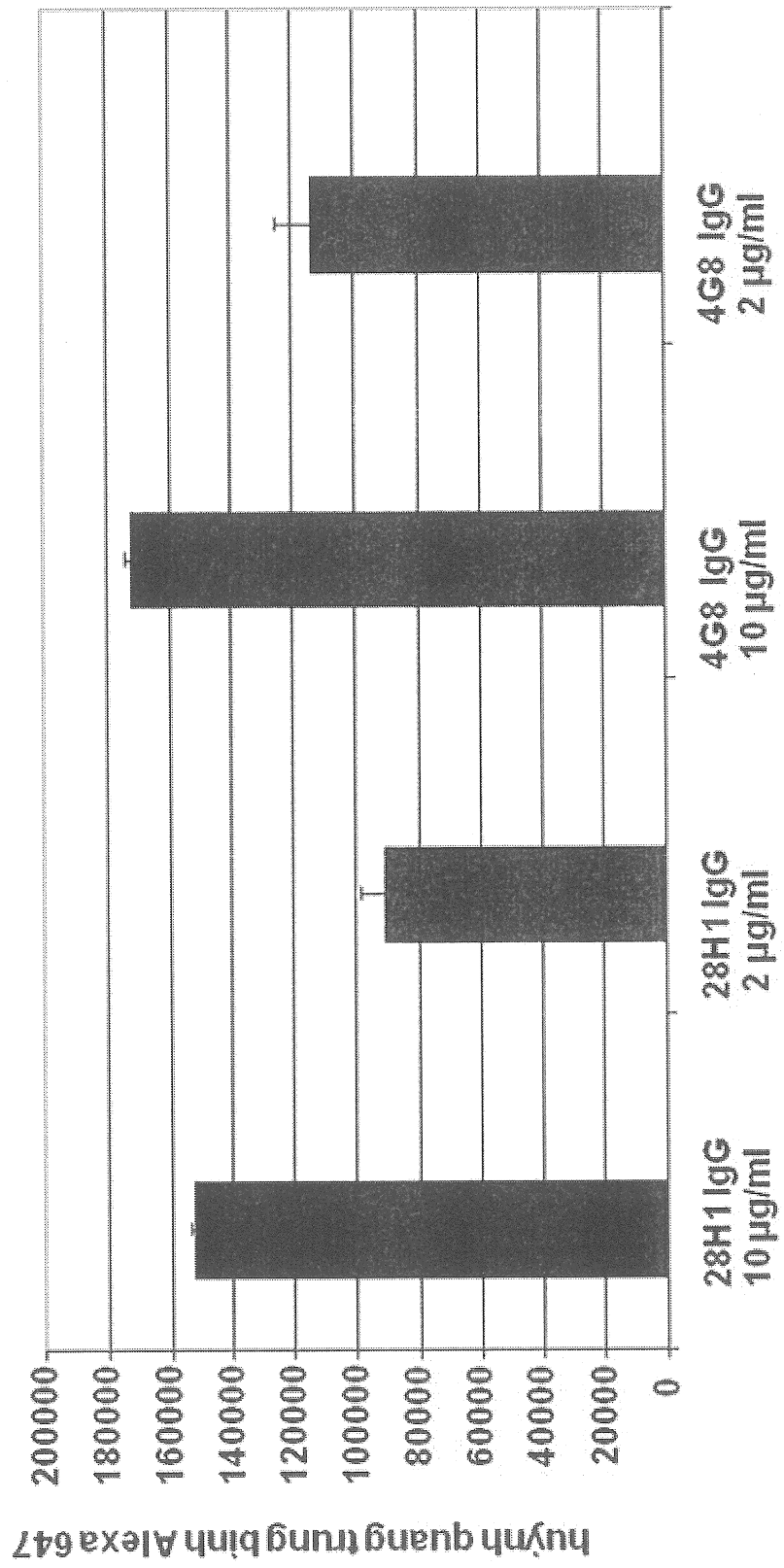
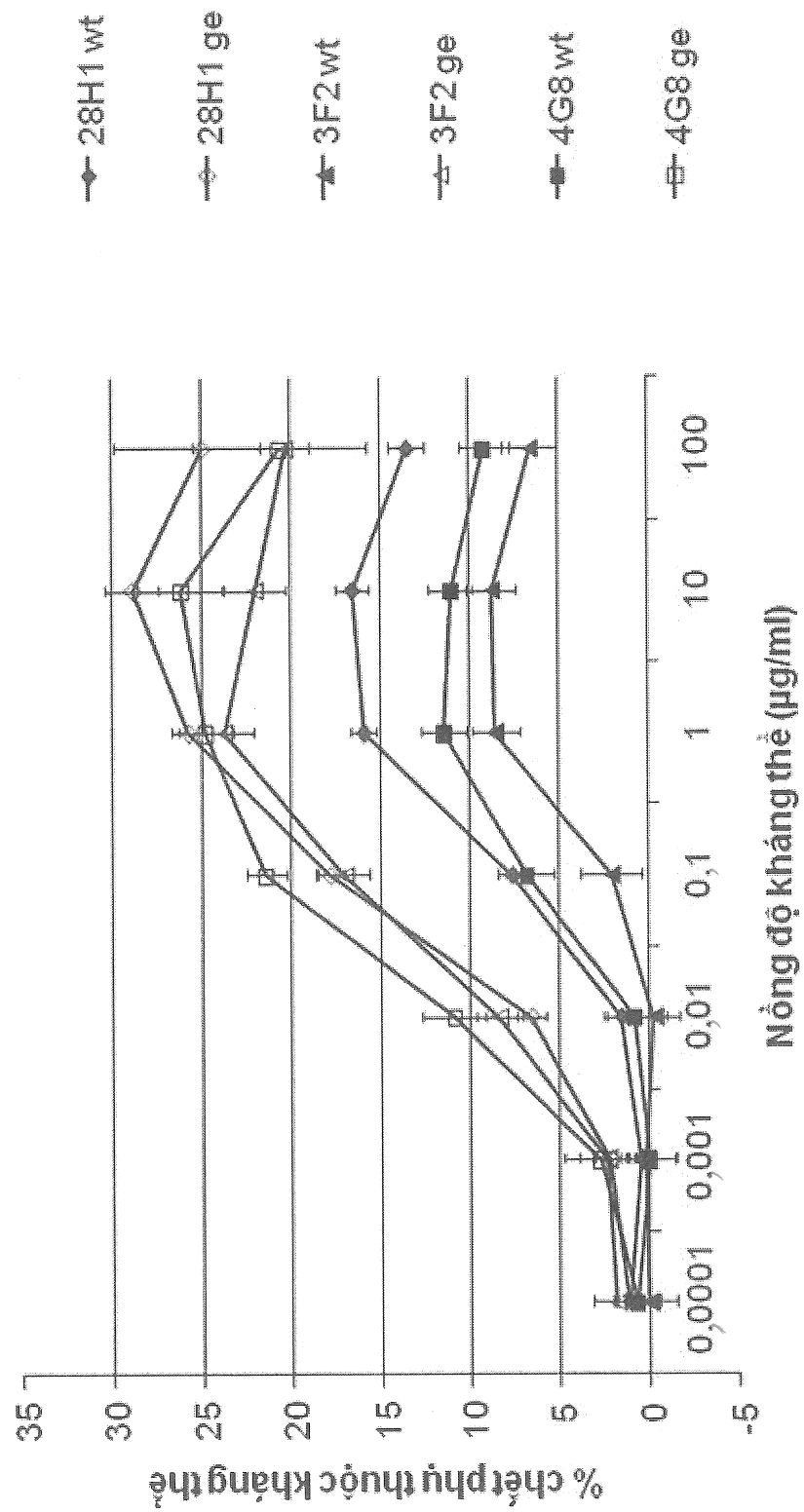


Fig. 24



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Roche Glycart AG

<120> Kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein kích hoạt nguyên bào sợi và phương pháp tạo ra kháng thể này

<130> 26953

<160> 352

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1611

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mẫu thư viện cho thư viện DP47-3

<400> 1

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc	60
atggccgaaa tcgtgttaac gcagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga	120
gccaccctct cttgcagggc cagtcagagt gttagcagca gctacttagc ctggtaccag	180
cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atctatggag catccagcag ggccactggc	240
atcccagaca ggttcagtgg cagtggatcc gggacagact tcaactctcac catcagcaga	300
ctggagcctg aagattttgc agtgtattac tgtcagcagt atggtagctc accgctgacg	360
ttcggccagg ggaccaaagt ggaaatcaaa cgtacgggtg ctgcaccatc tgtcttcac	420
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat	480
aactttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt	540
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	600
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc	660
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg tggagccgca	720
gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg aatggagccg cagactacaa ggacgacgac	780
gacaaggggtg ccgcataata aggcgcgcca attctatttc aaggagacag tcatatgaaa	840
tacctgctgc cgaccgctgc tgctgggtctg ctgctcctcg ctgcccagcc ggcgatggcc	900
gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	960
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct	1020
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	1080
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	1140
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccgttt	1200

ccgtatTTTTg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaaa 1260
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 1320
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc 1380
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 1440
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 1500
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaagtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 1560
gcggccgcaa gcactagtgc ccatcaccat caccatcacg ccgcggcata g 1611

<210> 2

<211> 1617

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mẫu thu viện cho thư viện DP88-3

<400> 2

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
atggccgata tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt cggagaccgg 120
gtcaccatca cctgccgggg aagtcagggc attagaaatg atttaggctg gtaccagcag 180
aagccaggga aagcccctaa gcgcctgac tatgctgcat ccagtttgca gagtggcgtc 240
ccatcaagggt tcagcggcag tggatccggg acagagttca ctctcacat cagcagcttg 300
cagcctgaag attttgccac ctattactgc ttgcagcata atagttaccc cacgtttggc 360
cagggcacca aagtcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccc 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtggagc cgcagaacaa 720
aaactcatct cagaagagga tctgaatgga gccgcagact acaaggacga cgacgacaag 780
ggtgccgcat aataaggcgc gccaatctta tttcaaggag acagtcatat gaaatacctg 840
ctgccgaccg ctgctgctgg tctgctgctc ctgctgccc agccggcgat ggcccagggtg 900
caattggtgc agtctggggc tgagggtgaag aagcctgggt cctcggtgaa ggtctcctgc 960
aaggcctccg gaggcacatt cagcagctac gctataagct ggggtgcgaca ggcccctgga 1020
caagggctcg agtggatggg agggatcatc cctatctttg gtacagcaaa ctacgcacag 1080

aagttccagg gcaggggtcac cattactgca gacaaatcca cgagcacagc ctacatggag 1140
ctgagcagcc tgagatctga ggacaccgcc gtgtattact gtgcgagact atccccaggg 1200
ggttactatg ttatggatgc ctgggggcca gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 1260
accaaaggcc catcgggtctt cccctctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 1320
gcggccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 1380
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 1440
tactccctca gcagcgtggc gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 1500
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaagtggaca agaaagttga gcccaaattc 1560
tgtgacgcgg ccgcaagcac tagtgcccat caccatcacc atcacgccgc ggcatag 1617

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 Kabat (1)

<400> 3

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 4
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 Kabat (1) (ADN 1)

<400> 4

agttatgcca tgagc

15

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 Kabat (2)

<400> 5

Ser Tyr Thr Met Ser
1 5

<210> 6
<211> 15

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (2) (ADN)

<400> 6
 agttatacca tgagc

15

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (3)

<400> 7

Ser Phe Ala Met Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (3) (ADN)

<400> 8
 agtttttgcca tgagc

15

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (4)

<400> 9

Ser His Ala Met Ser
 1 5

<210> 10
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (4) (ADN)

<400> 10
 agtcattgcta tgagc

15

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (5)

<400> 11

Ser Ser Ala Met Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (5) (ADN)

<400> 12
 agttctgccg tgagc

15

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Chothia (1)

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Chothia (1) (ADN)

<400> 14
 ggattcacct ttagcagtta t

21

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Chothia (2)

<400> 15

Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 Chothia (2) (ADN)

<400> 16

ggatccacct ttagcagtta t

21

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 Chothia (3)

<400> 17

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
1 5

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 Chothia (3) (ADN)

<400> 18

ggattcacct ttagcagttt t

21

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 Chothia (4)

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
1 5

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 Chothia (4) (ADN)

<400> 20

ggattcacct ttagcagtca t

21

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 Chothia (5)

<400> 21

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser

1

5

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 Chothia (5) (ADN)

<400> 22

ggattcacct ttagcagttc t

21

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 AbM (1)

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1

5

10

<210> 24

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 AbM (1) (ADN 1)

<400> 24

ggattcacct ttagcagttta tgccatgagc

30

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 AbM (2)

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 AbM (2) (ADN)

<400> 26
 ggatccacct ttagcagtta tgccatgagc

30

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 AbM (3)

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 AbM (3) (ADN)

<400> 28
 ggattcacct ttagcagtta taccatgagc

30

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 AbM (4)

<400> 29

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met Ser
1 5 10

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

<220>
<223> HCDR1 AbM (4) (ADN)

<400> 30
ggattcacct ttagcagttt tgccatgagc

30

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 AbM (5)

<400> 31

Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Ala Met Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 AbM (5) (ADN)

<400> 32
ggattcacct ttagcagtca tgctatgagc

30

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 AbM (6)

<400> 33

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 AbM (6) (ADN)

<400> 34

ggattcacct ttagcagttc tgccatgagc

30

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (1)

<400> 35

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 36

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (1) (ADN 1)

<400> 36

gctattagtg gtagtggttg tagcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (2)

<400> 37

Ala	Ile	Gly	Val	Ser	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 38

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (2) (ADN)

<400> 38

gctattggtg ttagtactgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 39

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (3)

<400> 39

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Ala	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 40
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (3) (ADN)

<400> 40
 gctattagtgg gagtgctgg ttatacatatc tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (4)

<400> 41

Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15

<210> 42
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (4) (ADN)

<400> 42
 gctattagtgg gtgggtgtag gacatactac gcagactccg tgaag

45

<210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (5)

<400> 43

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

<210> 44
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (5) (ADN)

<400> 44
 gcgattatta gtagtggtgg tctcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (6)

<400> 45

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (6) (ADN)

<400> 46
 gctattattg ggagtggttag tcgtacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 47
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (7)

<400> 47

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (7) (ADN)

<400> 48

gctattattg gtagtggtgc tagcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (8)

<400> 49

Ala	Ile	Trp	Gly	Gly	Gly	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 50

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (8) (ADN)

<400> 50

gctattttggg gtggtggtcg tagcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (9)

<400> 51

Ala	Ile	Ile	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 52

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (9) (ADN)

<400> 52

gctattatta gtagtggggc tagcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 53

<211> 16

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (10)

<400> 53

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

<210> 54
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (10) (ADN)

<400> 54
 gctatttttg ctagtggtgc gatcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (11)

<400> 55

Gly	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 56
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (11) (ADN)

<400> 56
 ggtattattg gtagtggtgg tatcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 57
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (12)

<400> 57

Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

10

15

<210> 58
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (12) (ADN)

<400> 58
 gctattcttg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (13)

<400> 59

Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Ser	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 60
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (13) (ADN)

<400> 60
 gctattattg gtagtggttag taacacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Kabat (14)

<400> 61

Ala	Ile	Trp	Ala	Ser	Gly	Glu	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15

<210> 62
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (14) (ADN)

<400> 62

gctatttggg ctagtgggga gcaatactac gcagactccg tgaag

45

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (15)

<400> 63

Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 64

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (15) (ADN)

<400> 64

gctattattg gtagtggttag tatcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (16)

<400> 65

Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

<210> 66

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (16) (ADN)

<400> 66

gctattattg gtagtggttg tatcacatac tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 67

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (17)

<400> 67

Ala Ile Ser Thr Asn Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 68

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Kabat (17) (ADN)

<400> 68

gctattagta ctaatggtaa ttatacatat tacgcagact ccgtgaag

48

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Chothia (1)

<400> 69

Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 70

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Chothia (1) (ADN 1)

<400> 70

agtggttagtg gtggtagcac a

21

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 Chothia (2)

<400> 71

Gly Val Ser Thr Gly Ser Thr
1 5

<210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (2) (ADN)

<400> 72
 ggtgtagta ctggttagcac a

21

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (3)

<400> 73

Ser Gly Ser Ala Gly Tyr Thr
 1 5

<210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (3) (ADN)

<400> 74
 agtgggagtg ctggttatac a

21

<210> 75
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (4)

<400> 75

Ser Gly Gly Gly Arg Thr
 1 5

<210> 76
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (4) (ADN)

<400> 76
agtgggtggtg gtaggaca

18

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 Chothia (5)

<400> 77

Ile Ser Ser Gly Gly Leu Thr
1 5

<210> 78
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 Chothia (5) (ADN)

<400> 78
attagtagtg gtggtctcac a

21

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 Chothia (6)

<400> 79

Ile Gly Ser Gly Ser Arg Thr
1 5

<210> 80
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 Chothia (6) (ADN)

<400> 80
attgggagtg gtagtcgtac a

21

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (7)

<400> 81

Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr
 1 5

<210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (7) (ADN)

<400> 82
 attggtagtgtgtgctagcac a

21

<210> 83
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (8)

<400> 83

Trp Gly Gly Gly Arg Ser Thr
 1 5

<210> 84
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (8) (ADN)

<400> 84
 attggtagtgtgtgctagcac a

21

<210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (9)

<400> 85

Ile Ser Ser Gly Ala Ser Thr
 1 5

<210> 86
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (9) (ADN)

<400> 86
 attagtagtg gggctagcac a

21

<210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (10)

<400> 87

Leu Ala Ser Gly Ala Ile Thr
 1 5

<210> 88
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (10) (ADN)

<400> 88
 ttggctagtg gtgcgatcac a

21

<210> 89
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (11)

<400> 89

Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr
 1 5

<210> 90
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (11) (ADN)

<400> 90
attggtagtgtg gtggtatcac a

21

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 Chothia (12)

<400> 91

Leu Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 92
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 Chothia (12) (ADN)

<400> 92
cttggtagtgtg gtggtagcac a

21

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 Chothia (13)

<400> 93

Ile Gly Ser Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 94
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 Chothia (13) (ADN)

<400> 94
attggtagtgtg gtagtaacac a

21

<210> 95
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (14)
 <400> 95

Trp Ala Ser Gly Glu Gln
 1 5

<210> 96
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (14) (ADN)

<400> 96
 tgggctagtg gggagcaa

18

<210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (15)

<400> 97

Ile Gly Ser Gly Ser Ile Thr
 1 5

<210> 98
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (15) (ADN)

<400> 98
 attggtagt gtagtatcac a

21

<210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (16)

<400> 99

Ser Thr Asn Gly Asn Tyr Thr
 1 5

<210> 100
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 Chothia (16) (ADN)

<400> 100
 agtactaatg gtaattatac a

21

<210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (1)

<400> 101

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 102
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (1) (ADN 1)

<400> 102
 gctattagtg gtagtggtgg tagcaca

27

<210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (2)

<400> 103

Ala Ile Gly Val Ser Thr Gly Ser Thr
 1 5

<210> 104
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (2) (ADN)

<400> 104

gctattgggtg ttagtactgg tagcaca

27

<210> 105
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (3)

<400> 105

Ala Ile Ser Gly Ser Ala Gly Tyr Thr
 1 5

<210> 106
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (3) (ADN)

<400> 106
 gctattagtg ggagtgctgg ttataca

27

<210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (4)

<400> 107

Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Thr
 1 5

<210> 108
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (4) (ADN)

<400> 108
 gctattagtg gtggtagtag gaca

24

<210> 109
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (5)

<400> 109

Ala Ile Ile Ser Ser Gly Gly Leu Thr
1 5

<210> 110

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (5) (ADN)

<400> 110

gcgattatta gtagtggtgg tctcaca

27

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (6)

<400> 111

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Arg Thr
1 5

<210> 112

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (6) (ADN)

<400> 112

gctattattg ggagtggtag tcgtaca

27

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (7)

<400> 113

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr
1 5

<210> 114

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR2 AbM (7) (ADN)

 <400> 114
 gctattattg gtagtggtgc tagcaca

27

<210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR2 AbM (8)

 <400> 115

 Ala Ile Trp Gly Gly Gly Arg Ser Thr
 1 5

<210> 116
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR2 AbM (8) (ADN)

 <400> 116
 gctatttggg gtggtgggtcg tagcaca

27

<210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR2 AbM (9)

 <400> 117

 Ala Ile Ile Ser Ser Gly Ala Ser Thr
 1 5

<210> 118
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR2 AbM (9) (ADN)

 <400> 118
 gctattatta gtagtggggc tagcaca

27

<210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (10)

<400> 119

Ala Ile Leu Ala Ser Gly Ala Ile Thr
 1 5

<210> 120
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (10) (ADN)

<400> 120
 gctatttttg ctagtgggtgc gatcaca

27

<210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (11)

<400> 121

Gly Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr
 1 5

<210> 122
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (11) (ADN)

<400> 122
 ggtattattg gtagtgggtgg tatcaca

27

<210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (12)

<400> 123

Ala Ile Leu Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 124

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (12) (ADN)

<400> 124

gctattcttg gtagtggtgg tagcaca

27

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (13)

<400> 125

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 126

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (13) (ADN)

<400> 126

gctattattg gtagtggttag taacaca

27

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 AbM (14)

<400> 127

Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln
1 5

<210> 128

<211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (14) (ADN)

<400> 128
 gctattttggg ctagtgggga gcaa

24

<210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (15)

<400> 129

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Ile Thr
 1 5

<210> 130
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (15) (ADN)

<400> 130
 gctattattg gtagtggttag tatcaca

27

<210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (16)

<400> 131

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr
 1 5

<210> 132
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (16) (ADN)

<400> 132
 gctattattg gtagtggtgg tatcaca

27

<210> 133
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (17)

<400> 133

Ala Ile Ser Thr Asn Gly Asn Tyr Thr
 1 5

<210> 134
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 AbM (17) (ADN)

<400> 134
 gctattagta ctaatggtaa ttataca

27

<210> 135
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 (1)

<400> 135

Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly
 1 5

<210> 136
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 (1) (ADN 1)

<400> 136
 tactgtgcga aaggggtgggtt tggt

24

<210> 137
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 (2)

<400> 137

Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly
1 5

<210> 138

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 (2) (ADN 1)

<400> 138

tactgtgcga aaggttggtt gggt

24

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 (3)

<400> 139

Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Thr
1 5

<210> 140

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 (3) (ADN)

<400> 140

tactgtgcga aaggttggtt tacg

24

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 (4)

<400> 141

Tyr Cys Ala Lys Ala Trp Met Gly
1 5

<210> 142

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 (4) (ADN)

<400> 142

tactgtgcga aagcttggaat gggg

24

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1 (1)

<400> 143

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Thr	Ser	Ser	Tyr	Leu
1				5					10	

<210> 144

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1 (1) (ADN)

<400> 144

agggccagtc agagtgttac cagtagctac tta

33

<210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1 (2)

<400> 145

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu
1				5					10	

<210> 146

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1 (2) (ADN)

<400> 146

agggccagtc agagtgttag cagcagctac tta

33

<210> 147
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 (3)

<400> 147

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu
 1 5 10

<210> 148
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 (3) (ADN)

<400> 148
 agggccagtc agagtgttag ccgcagctac tta

33

<210> 149
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 (4)

<400> 149

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu
 1 5 10

<210> 150
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 (4) (ADN 1)

<400> 150
 agggccagtc agagtgttag cagcaattac tta

33

<210> 151
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR2 (1)

<400> 151

Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala
1 5

<210> 152
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (1) (ADN)

<400> 152
aatgtgggct cccgtagggc c

21

<210> 153
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (2)

<400> 153

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala
1 5

<210> 154
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (2) (ADN)

<400> 154
tatggagcat ccagcagggc c

21

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (3)

<400> 155

Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala
1 5

<210> 156
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (3) (ADN)

<400> 156
attggggcct ccaccagggc c

21

<210> 157
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (4)

<400> 157

Tyr Gly Ala Tyr Ile Arg Ala
1 5

<210> 158
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (4) (ADN)

<400> 158
tatggcgccct acatcagggc c

21

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (5)

<400> 159

Gln Gly Ala Ser Ser Arg Ala
1 5

<210> 160
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 (5) (ADN)

<400> 160
cagggcgccct ccagcagggc c

21

<210> 161

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

<220>
 <223> LCDR2 (6)

<400> 161

Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Ala
 1 5

<210> 162
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR2 (6) (ADN)

<400> 162
 tatggtgcct ccattagggc c

21

<210> 163
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (1)

<400> 163

Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro
 1 5

<210> 164
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (1) (ADN)

<400> 164
 tgtcagcagg gtattatgct tcccccg

27

<210> 165
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (2)

<400> 165

Cys Gln Gln Gly Gln Leu Ile Pro Pro
1 5

<210> 166
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 (2) (ADN)

<400> 166
tgtcagcagg gtcagcttat tccccct

27

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 (3)

<400> 167

Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro
1 5

<210> 168
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 (3) (ADN)

<400> 168
tgtcagcagg gtcagggttat tccccct

27

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 (4)

<400> 169

Cys Gln Gln Gly Gln Gln Ile Pro Pro
1 5

<210> 170
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (4) (ADN)
 <400> 170
 tgtcagcagg gtcagcagat tccccct

27

<210> 171
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (5)

<400> 171

Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro Pro
 1 5

<210> 172
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (5) (ADN)

<400> 172
 tgtcagcagg gtaatcagat tccccct

27

<210> 173
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (6)

<400> 173

Cys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Pro Ser
 1 5

<210> 174
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (6) (ADN)

<400> 174
 tgtcagcagg gtctgaatat tccctcg

27

<210> 175
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (7)

<400> 175

Cys Gln Gln Gly His Ile Ile Pro Pro
 1 5

<210> 176
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (7) (ADN)

<400> 176
 tgtcagcagg gtcattattat tcccccg

27

<210> 177
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (8)

<400> 177

Cys Gln Gln Ala Ile Met Leu Pro Pro
 1 5

<210> 178
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 (8) (ADN)

<400> 178
 tgtcagcagg ctattatgct tcctccg

27

<210> 179
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (1) (ADN 2)

<400> 179
 agttatgcta tgagc

15

<210> 180
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (1) (ADN 3)

<400> 180
 agttatgcga tgagc

15

<210> 181
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 Kabat (1) (ADN 4)

<400> 181
 agttatgcaa tgagc

15

<210> 182
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 AbM (1) (ADN 2)

<400> 182
 ggattcacct ttagcagtta tgctatgagc

30

<210> 183
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 AbM (1) (ADN 3)

<400> 183
 ggattcacct ttagcagtta tgcgatgagc

30

<210> 184
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 AbM (1) (ADN 4)

<400> 184
 ggattcacct ttagcagtta tgcaatgagc

30

<210> 185
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR2 Kabat (1) (ADN 2)

 <400> 185
 gctattagcg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaag 48

 <210> 186
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR2 Chothia (1) (ADN 2)

 <400> 186
 agcggtagtg gtggtagcac a 21

 <210> 187
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR2 AbM (1) (ADN 2)

 <400> 187
 gctattagcg gtagtggtgg tagcaca 27

 <210> 188
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR3 (1) (ADN 2)

 <400> 188
 tactgtgcga aaggttggtt tggg 24

 <210> 189
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HCDR3 (2) (ADN 2)

 <400> 189
 tactgtgcga aaggttggtt ggggt 24

 <210> 190

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

<220>
 <223> HCDR3 (2) (ADN 3)

<400> 190
 tactgtgcga aaggttggtt ggggt

24

<210> 191
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 (4) (ADN 2)

<400> 191
 agggccagtc agagtgttag cagcaactac tta

33

<210> 192
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 (4) (ADN 3)

<400> 192
 agggccagtc agagtgttag cagtaactac tta

33

<210> 193
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 3F2; VL

<400> 193

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro

85

90

95

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

<210> 194
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 3F2; VL

<400> 194
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt atccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 195
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 3F2(YS); VL

<400> 195

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

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

<210> 196

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

<220>
 <223> 3F2(YS); VL

<400> 196
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccagggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 197
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 3F2; VH

<400> 197

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Gly	Trp	Phe	Gly	Gly	Phe	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser												115			

<210> 198
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 3F2; VH

<400> 198

```

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg      300
tttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t              351

```

<210> 199

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 3D9, VL

<400> 199

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Leu Ile Pro
          85           90           95

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

```

<210> 200

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 3D9, VL

<400> 200

```

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120

```

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagc ttattccccc tacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 201
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 3D9, VH

<400> 201

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Gly Val Ser Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 202
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 3D9, VH

<400> 202

gaggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccagact 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attggtgtta gtactggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg 300
 ctgggtcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 203
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 3D9(TA); VH

<400> 203

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Gly Val Ser Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 204
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 3D9(TA); VH

<400> 204

gaggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccgatt caccttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attggtgtta gtactggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg 300

ctgggtcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 205
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4G8; VL

<400> 205

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
 85 90 95

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

<210> 206
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4G8; VL

<400> 206

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagggttagc cgcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcatt ggggcctcca ccagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggacg gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtcagg ttattccccc tacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 207
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 4G8; VH

<400> 207

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 208

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 4G8; VH

<400> 208

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccgatt cacctttagc agttatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300

ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 209

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 4B3; VL

<400> 209

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Tyr Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> 4B3; VL

<400> 210
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcaattact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcgcctaca tcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagg ttattccccc tacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 211
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4B3; VH

<400> 211

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 212
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4B3; VH

<400> 212
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg 300
 ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

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

<220>
 <223> 4D6; VL

<400> 213

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Gln Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

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

<210> 214
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4D6; VL

<400> 214
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatccag ggcgcctcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagggtcagg ttattccccc tacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 215
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4D6; VH

<400> 215

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 216
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4D6; VH

<400> 216
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg 300
 ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 217
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2C6; VL

<400> 217

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Gln Ile Pro
 85 90 95

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

<210> 218
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2C6; VL

<400> 218
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag caggctggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagc agattcccc tacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 219
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2C6; VH

<400> 219

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Ala	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Gly	Trp	Phe	Gly	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser												115			

<210> 220
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 2C6; VH

<400> 220

```

gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatc caccttttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggga gtgctggtta tacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg      300
tttggaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t                  351

```

<210> 221

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 5H5; VL

<400> 221

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
          85           90           95

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

```

<210> 222

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 5H5; VL

<400> 222

```

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60

```

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagggtaatc agattccccc tacgttcggt 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 223
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5H5; VH

<400> 223

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Gly Trp Phe Thr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 224
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5H5; VH

<400> 224

gaggtgcaat tgttgagatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatacca tgagctgggt ccgccggtct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgggtg gtggtaggac atactacgca 180

gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aggttggttt 300
 acgccttttg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagt 348

<210> 225
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2C4; VL

<400> 225

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
 85 90 95

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

<210> 226
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2C4; VL

<400> 226

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agtaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcctcca ttagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtaatc agattcccc tacgttcggt 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 227
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2C4; VH

<400> 227

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
65					70				75					80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85						90					95			
Ala	Lys	Gly	Trp	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu		
			100					105					110				
Val	Thr	Val	Ser	Ser													
			115														

<210> 228
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2C4; VH

<400> 228

gaggtgcaat	tggttgagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc		60
tcctgtgcag	cctccggatt	cacctttagc	agttatgcca	tgagctgggt	ccgccaggct		120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctcagct	attagcggta	gtggtggtag	cacatactac		180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat		240
ctgcagatga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gaaaggttgg		300
tttacgcctt	ttgactactg	gggccaagga	accctgggtca	ccgtctcgag	t		351

<210> 229
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 2D9; VL

<400> 229

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
85 90 95

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

<210> 230

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 2D9; VL

<400> 230

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtaatc agattccccc tacgttcggt 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 231

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 2D9; VH

<400> 231

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Ser Tyr
	20	25	30
Ala Met Ser	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45
Ser Ala Ile	Ser Gly Ser Gly Gly	Ser Thr Tyr Tyr	Ala Asp Ser Val
	50	55	60
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg	Asp Asn Ser Lys	Asn Thr Leu Tyr
	65	70	75
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala	Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr Cys
	85	90	95
Ala Lys Gly	Trp Phe Thr Pro Phe	Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr Leu
	100	105	110
Val Thr Val	Ser Ser		
	115		

<210> 232
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2D9; VH

<400> 232
 gaggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagcggta gtggtggttag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggttg 300
 ttacgcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 233
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4B8; VL

<400> 233

Glu Ile Val	Leu Thr Gln Ser	Pro Gly Thr	Leu Ser Leu	Ser Pro Gly
1	5	10	15	
Glu Arg Ala	Thr Leu Ser Cys	Arg Ala Ser	Gln Ser Val	Ser Ser Ser
	20	25	30	

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

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

<210> 234
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4B8; VL

<400> 234
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagg ttattccccc tacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 235
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4B8; VH

<400> 235

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 236
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4B8; VH

<400> 236
 gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccat gagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 237
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 7A1; VL

<400> 237

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Gln Ile Pro

85

90

95

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

<210> 238
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 7A1; VL

<400> 238
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtcagc agattccccc tacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 239
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 7A1; VH

<400> 239

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 240
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 7A1; VH

<400> 240
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggttg 300
 tttgggaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 241
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 13C2; VL

<400> 241

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65				70						75				80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Gln	Leu	Ile	Pro
			85					90					95		
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 242
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 13C2; VL

<400> 242

```

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagggtcagc ttattcccc tacgttcggc      300
caggggacca aagtggaaat caaa                                             324

```

<210> 243

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 13C2; VH

<400> 243

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 244

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 13C2; VH

<400> 244

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggttg 300
 ctgggtcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 245
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 13E8; VL

<400> 245

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Leu	Asn	Ile	Pro
			85						90					95	
Ser	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 246
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 13E8; VL

<400> 246

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtctga atattccctc gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 247
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 13E8; VH

<400> 247

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 248
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 13E8; VH

<400> 248

gaggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg 300
ttgggtccgt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 249
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 14C10; VL

<400> 249

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	His	Ile	Ile	Pro
				85					90					95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 250
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 14C10; VL

<400> 250

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagggtcata ttattccccc gacgttcggc	300
caggggacca aagtggaaat caaa	324

<210> 251
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 14C10; VH

<400> 251

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Ala Trp Met Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 252

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 14C10; VH

<400> 252

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccgatt cacctttagc agttatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagcttgg 300
atggggcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 253

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 17A11; VL

<400> 253

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Pro
85 90 95

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

<210> 254

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 17A11; VL

<400> 254

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtctga atattccctc gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 255

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 17A11; VH

<400> 255

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 256
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 17A11; VH

<400> 256
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggttg 300
 ttgggtccgt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 257
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 19G1; VL

<400> 257

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

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

<210> 258
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 19G1; VL

<400> 258
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 259
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 19G1; VH

<400> 259

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ile Ser Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85		90		95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu					
	100		105		110
Val Thr Val Ser Ser					
	115				

<210> 260
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 19G1; VH

<400> 260
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagcg attattagta gtggtggtct cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 tttggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 261
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 20G8; VL

<400> 261

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser	
20 25 30	
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu	
35 40 45	
Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
50 55 60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu	
65 70 75 80	
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro	
85 90 95	
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 262
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 20G8; VL

<400> 262
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccagggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagggttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 263
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 20G8; VH

<400> 263

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75				80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Lys	Gly	Trp	Phe	Gly	Gly	Phe	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser												
			115													

<210> 264
 <211> 351

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 20G8; VH

<400> 264
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcaa tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggga gtggtagtcg tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg 300
 tttggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 265
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4B9; VL

<400> 265

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Thr	Ser	Ser	20	25	30	
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	35	40	45	
Ile	Asn	Val	Gly	Ser	Arg	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	65	70	75	80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ile	Met	Leu	Pro	85	90	95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	100	105						

<210> 266
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4B9; VL

<400> 266

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagggttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 267
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4B9; VH

<400> 267

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 268
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4B9; VH

<400> 268

gaggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccgatt cacctttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggta gtgggtgctag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg 300
 tttggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 269
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5B8; VL

<400> 269

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

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

<210> 270
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5B8; VL

<400> 270

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 271
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5B8; VH

<400> 271

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Trp Gly Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 272
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5B8; VH

<400> 272

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccgatt cacctttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct atttggggtg gtggtcgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 tttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 273
 <211> 108

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5F1; VL

<400> 273

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

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

<210> 274
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5F1; VL

<400> 274

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 275
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 5F1; VH

<400> 275

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ile Ser Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 276
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 5F1; VH

<400> 276
gaggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattagta gtgggggctag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
tttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 277
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14B3; VL

<400> 277

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 278
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 14B3; VL

<400> 278
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 279
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 14B3; VH

<400> 279

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Leu Ala Ser Gly Ala Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 280
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> 14B3; VH

 <400> 280
 gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attttggcta gtggtgcgat cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggcgc gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 tttggtgggt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

 <210> 281
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> 16F1; VL

 <400> 281
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

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

<210>	282
<211>	324
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 16F1; VL

[illegible]

<210>	283
<211>	117
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 16F1; VH

<400> 283

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 284
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 16F1; VH

<400> 284
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attattggta gtggtggtat cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
tttggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 285
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 16F8; VL

<400> 285

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Thr	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Asn	Val	Gly	Ser	Arg	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65				70						75				80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ile	Met	Leu	Pro
			85						90					95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 286
<211> 324
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 16F8; VL

<400> 286

```

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtca gagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc      300
caggggacca aagtggaaat caaa                                           324

```

<210> 287

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 16F8; VH

<400> 287

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ser Ala Ile Leu Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100         105         110
Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 288

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 16F8; VH

<400> 288
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attcttggtg gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
tttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtc c cgtctcgtc c 351

<210> 289
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> O3C9; VL

<400> 289

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Thr	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40						45		
Ile	Asn	Val	Gly	Ser	Arg	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ile	Met	Leu	Pro
			85						90					95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 290
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> O3C9; VL

<400> 290
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc gagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 291
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> O3C9; VH

<400> 291

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 292
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> O3C9; VH

<400> 292

gaggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttttgcca tgagctgggt ccgtcagtc 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggta gtggtagtaa cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg 300

tttgggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c

351

<210> 293
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> O2D7; VL

<400> 293

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 294
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> O2D7; VL

<400> 294

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcacccca 180

gacaggttca gtggcagtggt atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtgta ttactgtcag caggctatta tgcttcctcc gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 295
 <211> 117
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> O2D7; VH

<400> 295

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 296

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> O2D7; VH

<400> 296

gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggttag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg 300

tttgggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 297

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 28H1; VL

<400> 297

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

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

<210> 298

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 28H1; VL

<400> 298

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagggttagc cgcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcatt ggggcctcca ccagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtcagg ttattcccc tacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 299

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 28H1; VH

<400> 299

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His

20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 300
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 28H1; VH

<400> 300
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tctctgtgcag cctccggatt caccttttagc agtcatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct atttgggcta gtggggagca atactacgca 180
 gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aggggtggctg 300
 ggtaattttg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagt 348

<210> 301
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 22A3; VL

<400> 301

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45
 Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 302
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 22A3; VL

<400> 302
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagggttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccagggt cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 303
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 22A3; VH

<400> 303

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 304
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 22A3; VH

<400> 304
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggta gtggtagtat cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
tttggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 305
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 29B11; VL

<400> 305

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

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

<210> 306
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 29B11; VL

<400> 306
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 307
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 29B11; VH

<400> 307

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 308
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 29B11; VH

<400> 308
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggta gtggtggtat cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 tttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 309
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 23C10; VL

<400> 309

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Arg	Ser	20	25	30	
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	35	40	45	
Ile	Ile	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	65	70	75	80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Gln	Val	Ile	Pro	85	90	95	
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	100	105						

<210> 310
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 23C10; VL

<400> 310
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc cgcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcatt ggggcctcca ccagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagg ttattcccc tacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 311
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 23C10; VH

<400> 311

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Ser	20	25	30	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ser	Ala	Ile	Ser	Thr	Asn	Gly	Asn	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Gly	Trp	Leu	Gly	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser												115			

<210> 312
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 23C10; VH

<400> 312
 gaggtgcaat tggttgagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

```

tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttctgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtacta atggtaatta tacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg      300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t              351

```

```

<210> 313
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 313

```

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

```

225					230						235				240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

<210> 314
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 314
 gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc gcgaggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 315
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 315

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 316
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 316

cggtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 317
 <211> 748
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng ecto FAP của người+poly-lys-tag+his6-tag

<400> 317

Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
 20 25 30
 Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
 35 40 45
 Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
 50 55 60
 Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser
 65 70 75 80
 Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
 85 90 95
 Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
 100 105 110
 Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
 115 120 125
 Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
 130 135 140
 Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
 165 170 175
 Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
 180 185 190
 Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
 195 200 205
 Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
 210 215 220
 Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile
 225 230 235 240
 Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
 245 250 255
 Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
 260 265 270
 Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
 275 280 285
 Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
 290 295 300
 Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
 325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
 340 345 350
 Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
 355 360 365
 Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
 370 375 380
 Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
 405 410 415
 Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
 420 425 430
 Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
 435 440 445
 Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
 450 455 460
 Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
 465 470 475 480
 Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
 485 490 495
 Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
 500 505 510
 Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
 515 520 525
 Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
 530 535 540
 Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
 545 550 555 560
 Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
 565 570 575
 Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
 580 585 590
 Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
 595 600 605
 Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
 610 615 620
 Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
 625 630 635 640
 Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
 645 650 655
 Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His

660	665	670
Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala		
675	680	685
Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser		
690	695	700
Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr		
705	710	715
		720
His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys		
	725	730
		735
Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His		
740	745	

<210> 318

<211> 2244

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Human FAP ectodomain+poly-lys-tag+his6-tag

<400> 318

cgcccttcaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat	60
attttaaagt gaacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa	120
tatcttcatac aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca	180
tataccattt tgagtaatag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta cggcttatca	240
cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac	300
acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aatgagctt	360
cctcgtccaa ttcagtattt atgctggtcg cctgttgga gtaaattagc atatgtctat	420
caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaa aacattta	480
ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt	540
gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt	600
aatgatacgg atataccagt tattgcctat tcctattatg gcgatgaaca atacctaga	660
acaataaata ttccataccc aaaggctgga gctaagaatc ccgttggtcg gatatttatt	720
atcgatacca cttaccctgc gtatgtaggt cccaggaag tgcctgttcc agcaatgata	780
gcctcaagtg attattattt cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg	840
cagtggtctaa aaagagtcca gaatgtttcg gtcctgtcta tatgtgactt caggggaagac	900
tggcagacat gggattgtcc aaagaccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg	960
gctggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttcagctatg atgccatttc gtactacaaa	1020

```

atatttagtg acaaggatgg ctacaaacat attcactata tcaaagacac tgtggaaaat 1080
gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat 1140
tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gaataccctg gaagaagaaa catctacaga 1200
attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260
aggtgccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc 1320
tacggcccag gcatcccat ttccaccctt catgatggac gcactgatca agaaattaaa 1380
atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440
gaaattaaga aacttgaagt agatgaaatt actttatgggt acaagatgat tcttcctcct 1500
caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatgggtg tccctgcagt 1560
cagagtgtaa ggtctgtatt tgctgttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620
atggtcattg ccttgggtga tggtcgagga acagctttcc aaggtgacaa actcctctat 1680
gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740
ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatagcca tatggggctg gtcctatgga 1800
ggatacgttt catcactggc ccttgcattt ggaactgggc ttttcaaagtg tggatatagca 1860
gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920
ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980
gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040
tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctgggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100
atgtgggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160
cacatgaccc acttcctaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220
aagggccacc accatcacca tcac 2244

```

<210> 319

<211> 749

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng ecto FAP của chuột+poly-lys-tag+his6-tag

<400> 319

Arg Pro Ser Arg Val Tyr Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Glu Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp
35 40 45

Asn Ile Val Phe Tyr Asn Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu
 50 55 60
 Ser Asn Ser Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu Ser
 65 70 75 80
 Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
 85 90 95
 Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly
 100 105 110
 Glu Phe Val Arg Gly Tyr Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
 115 120 125
 Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
 130 135 140
 Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
 165 170 175
 Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly
 180 185 190
 Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile
 195 200 205
 Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
 210 215 220
 Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile
 225 230 235 240
 Val Asp Thr Thr Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val
 245 250 255
 Pro Glu Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
 260 265 270
 Val Ser Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
 275 280 285
 Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp
 290 295 300
 Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr
 325 330 335
 Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
 340 345 350
 Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
 355 360 365

Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
 370 375 380
 Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
 405 410 415
 Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys
 420 425 430
 Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser
 435 440 445
 Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu
 450 455 460
 Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val
 465 470 475 480
 Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met
 485 490 495
 Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
 500 505 510
 Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
 515 520 525
 Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
 530 535 540
 Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His
 545 550 555 560
 Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
 565 570 575
 Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
 580 585 590
 Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
 595 600 605
 Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
 610 615 620
 Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
 625 630 635 640
 Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
 645 650 655
 Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
 660 665 670
 Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
 675 680 685
 Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser

690	695	700
Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr		
705	710	715 720
Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly		
	725	730 735
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His		
	740	745

<210> 320

<211> 2247

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng ecto FAP của chuột+poly-lys-tag+his6-tag

<400> 320

cgctccctcaa gagtttacaac acctgaagga aacacaaaga gagctcttac cttgaaggat	60
atatttaaagt gaacattctc atataaaaca tatttttccca actggatttc agaacaagaa	120
tatcttcattc aatctgagga tgataacata gtattttata atattgaaac aagagaatca	180
tatatcattt tgagtaatag caccatgaaa agtgtgaatg ctacagatta tggtttgtca	240
cctgatcggc aatttggtgta tctagaaagt gattattcaa agctctggcg atattcatac	300
acagcgacat actacatcta cgaccttcag aatggggaat ttgtaagagg atacgagctc	360
cctcgtccaa ttcagtatct atgctggtcg cctggtggga gtaaattagc atatgtatat	420
caaaacaata tttatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacttatact	480
ggaagagaaa atagaatatt taatggaata ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt	540
gccacaaaat atgctctttg gtgggtctcca gatggaaaat ttttggcata tgtagaattt	600
aatgattcag atataccaat tattgcctat tcttattatg gtgatggaca gtatcctaga	660
actataaata ttccatatcc aaaggctggg gctaagaatc cggttggtcg tgtttttatt	720
gttgacacca cctaccctca ccacgtgggc ccaatggaag tgccagttcc agaaatgata	780
gcctcaagtg actattattt cagctggctc acatgggtgt ccagtgaacg agtatgcttg	840
cagtggtctaa aaagagtgca gaatgtctca gtcctgtcta tatgtgattt cagggaagac	900
tggcatgcat gggaaatgtc aaagaaccag gagcatgtag aagaaagcag aacaggatgg	960
gctggtggat tctttgtttc gacaccagct tttagccagg atgccacttc ttactacaaa	1020
atatttagcg acaaggatgg ttacaaacat attcactaca tcaaagacac tgtggaaaat	1080
gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccatatata tattccgcgt aacacaggat	1140
tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa ggttaccctg gaagaagaaa catctacaga	1200

```

attagcattg gaaactctcc tccgagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa      1260
aggtgccaat attacacagc aagtttcagc tacaaagcca agtactatgc actcgtctgc      1320
tatggccctg gcctcccat ttcaccctc catgatggcc gcacagacca agaaatacaa      1380
gtattagaag aaaacaaaga actggaaaat tctctgagaa atatccagct gcctaaagtg      1440
gagattaaga agctcaaaga cgggggactg actttctggt acaagatgat tctgcctcct      1500
cagtttgaca gatcaaagaa gtaccctttg ctaattcaag tgtatgggtg tccttgtagc      1560
cagagtgtta agtctgtggt tgctgttaat tggataactt atctcgcaag taaggagggg      1620
atagtcattg ccctggtaga tggtcggggc actgctttcc aaggtgacaa attcctgcat      1680
gccgtgtatc gaaaactggg tgtatatgaa gttgaggacc agctcacagc tgtcagaaaa      1740
ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaagaa agaatagcca tatggggctg gtcctacgga      1800
ggttatgttt catccctggc ccttgcattc ggaactgggc ttttcaaagtg tggcatagca      1860
gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcatctatct actcagagag attcatgggc      1920
ctcccaacaa aggacgacaa tctcgaacac tataaaaatt caactgtgat ggcaagagca      1980
gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac      2040
tttcagaact cagcacagat tgctaaagct ttgggttaatg cacaagtgga tttccaggcg      2100
atgtggtact ctgaccagaa ccatgggtata ttatctgggc gctcccagaa tcatttatat      2160
accacatga cgcacttcct caagcaatgc ttttctttat cagacggcaa aaagaaaaag      2220
aaaaagggcc accaccatca ccatcac                                          2247

```

```

<210> 321
<211> 748
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Cynomolgus FAP ectodomain+poly-lys-tag+his6-tag

```

```

<400> 321

```

```

Arg Pro Pro Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1          5          10          15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
          20          25          30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
          35          40          45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
          50          55          60

Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser
65          70          75          80

```


Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
 85 90 95
 Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
 100 105 110
 Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
 115 120 125
 Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
 130 135 140
 Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
 165 170 175
 Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
 180 185 190
 Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
 195 200 205
 Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
 210 215 220
 Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile
 225 230 235 240
 Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
 245 250 255
 Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
 260 265 270
 Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
 275 280 285
 Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
 290 295 300
 Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
 325 330 335
 Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
 340 345 350
 Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
 355 360 365
 Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
 370 375 380
 Ser Ser Asn Glu Phe Glu Asp Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
 385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
 405 410 415
 Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
 420 425 430
 Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
 435 440 445
 Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
 450 455 460
 Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
 465 470 475 480
 Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
 485 490 495
 Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
 500 505 510
 Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
 515 520 525
 Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
 530 535 540
 Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
 545 550 555 560
 Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
 565 570 575
 Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
 580 585 590
 Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
 595 600 605
 Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
 610 615 620
 Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
 625 630 635 640
 Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
 645 650 655
 Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
 660 665 670
 Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
 675 680 685
 Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
 690 695 700
 Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
 705 710 715 720
 His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys

725

730

735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
 740 745

<210> 322

<211> 2247

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng ecto FAP của Cynomolgus+poly-lys-tag+his6-tag (ADN)

<400> 322

```
cgccctccaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat      60
attttaaattg ggacatttttc ttataaaaca tttttttccaa actggatttc aggacaagaa      120
tatcttcattc aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca      180
tataccatttt tgagtaacag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta tggccttatca      240
cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac      300
acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aatgagctt      360
cctcgtccaa ttcagtattt atgctggtcg cctggttgga gtaaattagc atatgtctat      420
caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacatttaat      480
ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt      540
gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt      600
aatgatacag atataccagt tattgcctat tcctattatg gcgatgaaca atatcccaga      660
acaataaata ttccataccc aaaggccgga gctaagaatc cttttgttcg gatattttatt      720
atcgatacca cttaccctgc gtatgtaggt cccaggaag tgctgttcc agcaatgata      780
gcctcaagtg attattattt cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg      840
cagtggtctaa aaagagtcca gaatgtttcg gtcttgtcta tatgtgattt cagggaagac      900
tggcagacat gggattgtcc aaagaccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg      960
gctggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttcagctatg atgccatttc atactacaaa     1020
atatttagtg acaaggatgg ctacaaacat attcactata tcaaagacac tgtggaaaat     1080
gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat     1140
tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gattaccctg gaagaagaaa catctacaga     1200
attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa     1260
aggtgccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc     1320
tatggcccag gcatcccat ttccaccctt catgacggac gactgatca agaaattaaa     1380
```

atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440
 gaaattaaga aacttgaagt agatgaaatt actttatggt acaagatgat tcttcctcct 1500
 caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatggtgg tccttgagct 1560
 cagagtgtaa ggtctgtatt tgctgttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620
 atgggtcattg ccttggtgga tggtcgggga acagctttcc aaggtgacaa actcctgtat 1680
 gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740
 ttcataaaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaataacca tatggggctg gtcctatgga 1800
 ggatatgttt catcactggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaagtg tgggatagca 1860
 gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920
 ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980
 gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040
 tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctgggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100
 atgtggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160
 cacatgaccc acttcctaaa gcagtgttcc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220
 aagggccacc accatcacca tcactga 2247

<210> 323
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 1

<400> 323

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 324
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 1 (ADN1)

<400> 324

atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc

57

<210> 325
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 1 (ADN 2)

<400> 325
 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 326
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 2

<400> 326

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

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
 20

<210> 327
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 2 (ADN)

<400> 327
 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctgggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 328
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 3

<400> 328

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 329
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 3 (ADN 1)

 <400> 329
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattcc 57

 <210> 330
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 3 (ADN 1)

 <400> 330
 atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc 57

 <210> 331
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự dẫn đầu 3 (ADN 3)

 <400> 331
 atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcaactct 57

 <210> 332
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> LMB3

 <400> 332
 caggaaacag ctatgaccat gattac 26

 <210> 333
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> LibL1b_mới

 <220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (26)..(27)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (32)..(33)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (35)..(36)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (38)..(39)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 333

cacttttggtc ccctggccga acgtmnnggg mnnmnnmnna ccctgctgac agtaatacac

60

tgc

63

<210> 334

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MS63

<400> 334

tttcgcacag taatatacgg ccgtgtcc

28

<210> 335

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MS64

<400> 335

acgttcggcc aggggaccaa agtgg

25

<210> 336

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Lib2H

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (23)..(24)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (26)..(27)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (29)..(30)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 336
 ggccgtatat tactgtgcga aannknnknn knnknnkttt gactactggg gccaaaggaac 60

<210> 337
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> fdseqlong

<400> 337
 gacgttagta aatgaatttt ctgtatgagg 30

<210> 338
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RJH_LIB3

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (26)..(27)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu misc
 <222> (41)..(42)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 338
 gactttggtg ccctggccaa acgtmnnnggg mnnmnnaccm nnctgcaagc agtaataggt 60
 ggcaaaatc 69

<210> 339
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RJH31

<400> 339
 acgtttggcc agggcaccaa agtcgag 27

<210> 340
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RJH32

<400> 340
 tctcgcacag taatacacgg cgggtgtcc 28

<210> 341
 <211> 94
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LIB88_2

<220>
 <221> dấu hiệu khác biệt
 <222> (29)..(55)
 <223> (33% GAC Asp; 26% GGT Gly; 10% GAA Glu; 9% CGT Arg; 7% Lys; 6% GTT Val; 5% TCT Ser; 4% CTG Leu)1 - (23% GGT Gly; 17% TAC Tyr; 16% TCT Ser; 11% GCT Ala; 9% CGT Arg; 7% AAC Asn; 6% ACT Thr; 6% GTT Val; 5% CCG Pro)8

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (30)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (38)..(39)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (41)..(42)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (44)..(45)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (47)..(48)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (50)..(51)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (53)..(54)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 341
 ggacaccgcc gtgtattact gtgcgagabn nnnbnnbnnb nnnbnnbnnb nnnbnnbtttga 60
 ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt ctcc 94

<210> 342
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DPK22_CDR1_rand_ba_opt

<400> 342
 caggtttctg ctggtaccag gctaagtagc tgctgctaac actctgactg gccctgcaag 60

<210> 343
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DPK22_CDR1_fo

<400> 343
 ttagcctggt accagcagaa acctg 25

<210> 344

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> DPK22_Ck_BsiWI_ba

 <400> 344
 ggtgcagcca ccgtacgttt gatttcc 27

 <210> 345
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> DPK22_CDR2_rand_ba

 <400> 345
 ctgtctggga tgccagtggc cctgctggag gcgccataga tgaggagcct gggagcctg 59

 <210> 346
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> DPK22_CDR2_fo

 <400> 346
 agggccactg gcatcccaga cag 23

 <210> 347
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> RJH53

 <400> 347
 catcagggcc tgagctcgcc cgtcac 26

 <210> 348
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> DP47_CDR1_rand_ba_opt

 <400> 348
 gagcctggcg gaccagctc atggcataac tgctaaaggt gaatccggag gc 52

 <210> 349
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DP47_CDR1_fo

<400> 349
 atgagctggg tccgccaggc tc

22

<210> 350
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MS52

<400> 350
 gaagaccgat gggccttttg tgctag

26

<210> 351
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DP47_CDR2_rand_ba

<400> 351
 ccttcacgga gtctgcgtag tatgtgctac caccactacc actaatagct gagacccact

60

ccagcccctt ccc

73

<210> 352
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DP47_CDR2_fo

<400> 352
 acatactacg cagactccgt gaagg
 25