



(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)



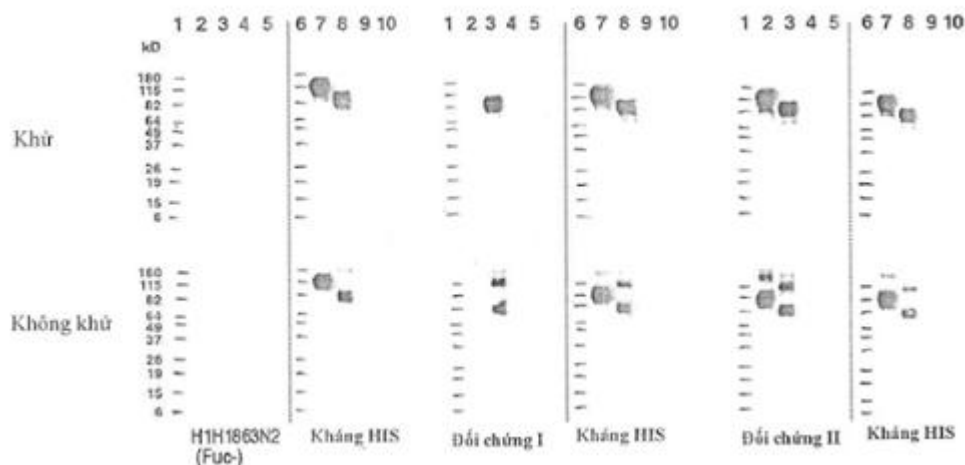
1-0030866

(51)⁷ C07K 16/28; A61P 35/00; A61K 39/395; (13) B
A61K 47/48

- (21) 1-2016-03141 (22) 10/03/2015
(86) PCT/US2015/019722 10/03/2015 (87) WO2015/138460 17/09/2015
(30) 61/950,963 11/03/2014 US
(45) 25/01/2022 406 (43) 27/02/2017 347A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591-6707, United States of America
(72) Jessica R. KIRSHNER (US); Douglas MACDONALD (US); Gavin THURSTON (US); Joel H. MARTIN (US); Frank DELFINO (US); Thomas NITTOLI (US); Marcus KELLY (US).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG BIẾN THỂ NHÓM III CỦA THỤ THỂ YẾU TỔ TĂNG TRƯỞNG BIỂU BÌ (EGFRvIII) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII người và dược phẩm chứa kháng thể này. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế liên kết EGFRvIII người với ái lực cao. Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể người có chiều dài đầy đủ. Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII liên hợp với chất gây độc tế bào, nuclit phóng xạ, hoặc phân gây bất lợi đến sự tăng sinh và phát triển của tế bào. Dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế rất hữu ích trong việc điều trị các bệnh ung thư.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể người và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể người liên kết đặc hiệu với các đột biến mất đoạn của thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), cụ thể là, đột biến mất nhóm III, EGFRvIII, và được phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc biểu hiện quá mức và/hoặc khuếch đại gen của thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF), hay EGFR, được ghi nhận trong nhiều khối u ở người, bao gồm khối u trong ung thư biểu mô vú, ung thư biểu mô buồng trứng, ung thư biểu mô bàng quang, ung thư biểu mô não và ung thư biểu mô tế bào vảy biến đổi (Wong, A.J. *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6899-6903; Harris *et al.*, 1992, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 11:181-187). Tuy nhiên, việc hướng đích EGFR làm liệu pháp điều trị chống ung thư gặp nhiều trở ngại do các mô bình thường cũng biểu hiện thụ thể này và chúng có thể trở thành đích cùng với đích khối u. Trong khi đó, các nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rằng nhiều khối u nguyên bào đệm có khuếch đại gen EGFR thường có sự sắp xếp lại các gen (Ekstrand, A.J. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4309-4313; Wong A.J. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2965-2969). Theo một nghiên cứu, đã phát hiện ra rằng, 17 trên 44 khối u nguyên bào đệm có một hoặc nhiều biến đổi trong trình tự mã hóa EGFR và tất cả các trường hợp đều chứa EGFR được khuếch đại, trong khi không có trường hợp nào trong 22 trường hợp không có khuếch đại gen cho thấy có bất thường trong trình tự đặc hiệu khối u (Frederick, L. *et al.*, 2000, *Cancer Res* 60:1383-1387). Nghiên cứu tương tự cũng chỉ ra rằng, nhiều loại đột biến EGFR có thể được phát hiện trong những khối u riêng lẻ.

Biến thể nhóm III của EGFR (EGFRvIII) là biến thể EGFR xuất hiện nhiều nhất trong u nguyên bào đệm (Bigner *et al.*, 1990, *Cancer Res* 50:8017-8022; Humphrey *et al.*, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4207-4211; Yamazaki *et al.*, 1990, *Jap J Cancer Res* 81:773-779; Ekstrand *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4309-4313; Wikstrand *et al.*, 1995, *Cancer Res* 55:3140-3148; và Frederick *et al.*, 2000, *Cancer Res* 60:1383-1387). EGFRvIII được đặc trưng bởi đột biến mất đoạn exon 2-7

trên gen EGFR, dẫn đến mất trong khung 801 cặp bazơ của vùng mã hóa, đồng nghĩa với việc mất 6-273 gốc axit amin (so với số lượng gốc axit amin của EGFR trưởng thành), cũng như tạo ra gốc glyxin mới tại cầu nối dung hợp (Humphrey *et al.*, 1988, *Cancer Res* 48:2231-2238; Yamazaki *et al.*, 1990, *supra*). EGFRvIII được chỉ ra là có một phối tử độc lập, yếu nhưng về cơ bản có hoạt tính kinaza hoạt hóa cũng như khả năng tăng cường khối u (Nishikawa *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7727-7731; và Batra *et al.*, 1995, *Cell Growth and Differentiation* 6:1251-1259). Ngoài u thần kinh đệm, EGFRvIII cũng được phát hiện trong ung thư biểu mô ống dẫn sữa và ung thư biểu mô tuyến vú (Wikstrand *et al.*, 1995, *Cancer Res* 55:3140-3148), ung thư biểu mô phổi tế bào không nhỏ (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993, *Cancer Res* 53:3217-3220), ung thư biểu mô buồng trứng (Moscatello *et al.*, 1995, *Cancer Res* 55:5536-5539), ung thư tuyến tiền liệt (Olapade-Olaopa *et al.*, 2000, *British J Cancer* 82:186-194), và ung thư biểu mô tế bào vảy ở đầu và cổ (Tinhofer *et al.*, 2011, *Clin Cancer Res* 17(15):5197-5204). Tuy nhiên, những nghiên cứu này và những nghiên cứu khác ghi nhận rằng các mô bình thường không biểu hiện EGFRvIII (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993, *supra*; Wikstrand *et al.*, 1995, *supra*; và Wikstrand *et al.*, 1998, *J Neuro Virol* 4:148-158). Tính đặc hiệu khối u cao của EGFRvIII khiến nó trở thành đích đặc biệt hữu hiệu trong điều trị các khối u và ung thư biểu hiện phân tử này.

Trình tự axit nucleic và trình tự axit amin của EGFR người lần lượt được nêu trong SEQ ID No: 145 và 146, và trình tự axit amin của EGFRvIII được nêu trong SEQ ID No: 147. Các kháng thể liên kết với EGFRvIII được mô tả trong, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ US 5,212,290, US 7,736,644, US 7,589,180 và US 7,767,792. Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2009/067242 mô tả kháng thể kháng EGFRvIII 11F8. Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2006/009694 mô tả kháng thể kháng EGFRvIII cetuximab. Freeman *et al.* (*J. Clin. Oncol.* 26 (15 Supplement): 14536, 2008) mô tả panitumumab và cetuximab. WO 2005/010151 mô tả kháng thể kháng EGFRvIII liên kết trong peptit nối. US 2009/269343 mô tả kháng thể liên kết với EGFR và kháng EGFRvIII. WO 2010/096434 mô tả kháng thể kháng EGFRvIII mAb806, 528 và DH8.3. Modjtahedi *et al.* (*Int. J. Cancer* 105(2):273-280, 2003) mô tả kháng thể kháng EGFR ICR62. Jiang *et al.* (*J. Biol. Chem.* 286(7): 5913-5920) mô tả kháng thể kháng EGFRvIII CH12.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể được phân lập và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với EGFRvIII người, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó chứa tổ hợp trình tự axit amin HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 là SEQ ID No: : 36/38/40/44/46/48. Các kháng thể theo sáng chế rất hữu ích, không kể những cái khác, trong việc hướng đích đến các tế bào khối u biểu hiện EGFRvIII. Kháng thể kháng EGFRvIII và mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, có thể được sử dụng một mình ở dạng chưa biến đổi hoặc có thể được sử dụng như một phần của liên hợp kháng thể-thuốc hoặc kháng thể đặc hiệu kép (bispecific).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế liên kết đặc hiệu với EGFRvIII và chất mang dược dụng. Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể là kháng thể người tái tổ hợp hoặc mảnh của nó. Theo khía cạnh liên quan, sáng chế mô tả chế phẩm là tổ hợp của kháng thể kháng EGFRvIII và chất trị liệu thứ hai. Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai là chất bất kỳ có khả năng kết hợp với kháng thể kháng EGFRvIII một cách thuận lợi. Sáng chế cũng đề cập đến liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) bao gồm kháng thể kháng EGFRvIII liên hợp với chất gây độc tế bào. Các liệu pháp kết hợp, các đồng công thức, và các ADC lấy làm ví dụ chứa kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế được bộc lộ ở các phần khác trong tài liệu này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) để sử dụng trong phương pháp điều trị ung thư, giảm sinh trưởng khối u và/hoặc gây ra suy giảm khối u ở bệnh nhân, ADC bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và chất gây độc tế bào, trong đó (a) kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của ADC liên kết đặc hiệu với EGFRvIII nhưng không liên kết với peptit nêu trong SEQ ID NO:148 hoặc peptit nêu trong SEQ ID NO:165, và trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó chứa tổ hợp của các trình tự axit amin HCDR1/HCDR2/HCDR3 /LCDR1/LCDR2/LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48, và phương pháp bao gồm cung cấp ADC cho bệnh nhân cần điều trị; hoặc (b) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của ADC liên kết đặc hiệu với EGFRvIII và cũng liên kết với peptit nêu trong SEQ ID NO:148 và/hoặc peptit nêu trong SEQ ID NO:165, và phương pháp bao gồm cung cấp ADC và ADC bổ sung gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và chất gây độc tế bào, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của ADC thứ hai liên kết đặc hiệu với

EGFRvIII nhưng không liên kết với peptit nổi nêu trong SEQ ID NO:148 hoặc peptit nêu trong SEQ ID NO:165, và trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó trong ADC bổ sung gồm tổ hợp của trình tự axit amin HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48 cho bệnh nhân cần điều trị.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ chứa phần liên kết kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab, F(ab')₂ hay scFv), và có thể được biến đổi để phù hợp với chức năng, ví dụ, để loại bỏ các chức năng phản ứng không cần thiết (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Các kháng thể kháng EGFRvIII được liệt kê trong Bảng 1 và Bảng 2. Bảng 1 trình bày các trình tự nhận biết axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của các kháng thể kháng EGFRvIII lấy làm ví dụ. Bảng 2 trình bày các trình tự nhận biết axit nucleic của HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của các kháng thể kháng EGFRvIII lấy làm ví dụ.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm HCVR có chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm LCVR chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm một cặp trình tự axit amin HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) chứa trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 bắt cặp với trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1. Kháng thể hay mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR chứa bất kỳ kháng thể kháng EGFRvIII nào được

liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được lựa chọn từ nhóm bao gồm: 2/20, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, và 130/138.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) chứa trình tự axit amin được lựa chọn từ các trình tự axit amin LCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất

95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm một cặp trình tự axit amin HCDR3 và LCDR3 (HCDR3/LCDR3) chứa trình tự axit amin HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 bắt cặp với trình tự axit amin LCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1. Theo như các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể hay các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 trong kháng thể kháng EGFRvIII lấy làm ví dụ bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm tập hợp 6 CDR (tức là, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) trong bất kỳ kháng thể kháng EGFRvIII được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; và 132-134-136-140-142-144.

Theo các phương án liên quan, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII, bao gồm tập hợp 6 CDR (tức là, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được xác định bởi bất kỳ kháng thể kháng EGFRvIII lấy làm ví dụ nào được liệt kê trong Bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII, chứa tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm: 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; và 370/378. Các phương pháp và kỹ thuật để nhận biết CDR trong trình tự axit amin HCVR và LCVR đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được sử dụng để nhận biết CDR trong trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR đặc hiệu được bộc lộ trong sáng chế. Các tiêu chuẩn có thể được sử dụng để nhận biết giới hạn của CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia và định nghĩa AbM. Trong các thuật ngữ, về cơ bản, định nghĩa Kabat dựa trên sự biến đổi trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của các vùng lặp cấu trúc, và định nghĩa AbM là sự kết hợp giữa hai định nghĩa Kabat và Chothia. Tham khảo, ví dụ, Kabat, "Trình tự của Protein quan tâm trong

miễn dịch học" Viện sức khỏe quốc gia, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Các cơ sở dữ liệu công khai cũng có sẵn để nhận biết trình tự CDR trong kháng thể.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho kháng thể kháng EGFRvIII hoặc các phần của nó cũng được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 được mô tả trong bản mô tả này; theo phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 được mô tả trong bản mô tả này; theo phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 được mô tả trong bản mô tả này; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 được mô tả trong bản mô tả này; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 được mô tả trong bản mô tả này; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCDR1 bất kỳ được liệt kê

trong Bảng 1 được mô tả trong bản mô tả này; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 được mô tả trong bản mô tả này; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 được mô tả trong bản mô tả này; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho HCVR được mô tả trong bản mô tả này, trong đó HCVR bao gồm tập hợp 3 CDR (tức là, HCDR1-HCDR2-HCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3 được xác định bởi kháng thể kháng EGFRvIII lấy làm ví dụ bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho LCVR được mô tả trong bản mô tả này, trong đó LCVR bao gồm tập hợp 3 CDR (tức là, LCDR1-LCDR2-LCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin LCDR1-LCDR2-LCDR3 được xác định bởi kháng thể kháng EGFRvIII lấy làm ví dụ bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho cả HCVR và LCVR được mô tả trong bản mô tả này, trong đó, HCVR bao gồm trình tự axit amin từ trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, và trong đó, LCVR bao gồm trình tự axit amin từ trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần giống có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% và trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự các axit nucleic LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự tương đối giống có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%. Theo các phương án nhất định trong khía cạnh này

của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hóa cho một HCVR và LCVR, trong đó HCVR và LCVR đều có nguồn gốc từ cùng một kháng thể kháng EGFRvIII được liệt kê trong Bảng 1.

Vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polypeptit có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EGFRvIII được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp có chứa các phân tử axit nucleic bất kỳ được đề cập ở trên, tức là, các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự HCVR, LCVR và/hoặc CDR bất kỳ được trình bày ở Bảng 1. Cũng nằm trong phạm vi sáng chế là các tế bào chủ chứa các vector này, cũng như các phương pháp sản xuất kháng thể hoặc các mảnh của nó bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong điều kiện cho phép sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể và thu hồi kháng thể và mảnh kháng thể được sản xuất.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII có mô hình glycosyl hóa được biến đổi. Theo một số phương án, việc biến đổi để loại bỏ vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể rất có ích, hoặc kháng thể thiếu gốc fucosa có mặt trên chuỗi oligosaccharit, ví dụ, để tăng cường khả năng gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (xem Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Theo ứng dụng khác, việc biến đổi quá trình galactosyl hóa có thể được thực hiện để thay đổi khả năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Phương pháp điều trị để tiêu diệt tế bào khối u hoặc ức chế hoặc làm giảm sự sinh trưởng tế bào khối u sử dụng kháng thể kháng EGFRvIII hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Phương pháp điều trị bao gồm cung cấp lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể cho đối tượng cần điều trị. Các rối loạn được điều trị là bệnh hoặc triệu chứng bất kỳ có thể được cải thiện, trở nên tốt hơn, được ức chế hoặc ngăn chặn bằng cách hướng đích đến EGFRvIII và/hoặc ức chế tín hiệu phối tử-trung gian tế bào thông qua EGFRvIII.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng từ việc xem xét tiếp các mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là kết quả của thử nghiệm western blot EGFR và EGFRvIII sử dụng kháng thể kháng EGFRvIII [tức là, H1H1863N2(Fuc-), và đối chứng I và II ở Fig.1a;

và H1H1911, H1H1912, và H1H1915 ở Fig.1b], hoặc kháng thể kháng His dưới điều kiện khử (bảng trên) và không khử (bảng dưới). Bảng 1 và 6: 10 μ l BENCHMARK™ tiêu chuẩn (INVITROGEN™); Bảng 2 và 7: 400 ng hEGFR-mmh (SEQ ID No: 154); Bảng 3 và 8: 400 ng hEGFR-mmh (SEQ ID No: 152); Bảng 4, 5, 9 và 10: trống. Đối chứng I: kháng thể peptit nổi kháng EGFRvIII ở người (IgG1) được bọc lộ trong bảng sáng chế Mỹ số 7,736,644; và đối chứng II: kháng thể kháng EGFRvIII/EGFR thể khảm được bọc lộ trong bảng sáng chế Mỹ số 7,589,180.

Fig.2 thể hiện các đặc tính liên kết của H1H1863N2(Fuc-). Peptit nổi EGFRvIII hoặc peptit của các gốc 311-326 của EGFR (“peptit EGFR311-326”), mỗi peptit đều được đánh dấu thông qua một liên kết với biotin ở đầu C, được bắt vào các đầu hút OCTET® phủ streptavidin trên thiết bị FORTEBIO® OCTET® RED và phản ứng với H1H1863N2(Fuc-) hoặc đối chứng I-III. Đối chứng I và II: Giống như trên; và đối chứng III: kháng thể kháng EGFRvIII nhân hóa (hIgG1) được bọc lộ trong đơn sáng chế Mỹ số 2010/0056762. (□): Peptit nổi EGFRvIII có đầu C gắn nhãn biotin (SEQ ID No: 149); và (■): Peptit nổi EGFR311-326 có đầu C gắn nhãn biotin (SEQ ID No: 151).

Fig.3 thể hiện quá trình nội bào hóa của mAb kháng EGFRvIII bằng tế bào HEK293 biểu hiện EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII). Các kháng thể kháng EGFRvIII gắn trên bề mặt tế bào và các kháng thể đối chứng được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp (Fab) kết hợp với thuốc nhuộm; hình ảnh ở độ phóng đại 40x và các hạt nội bào hóa được định lượng. Đối chứng I và II: Giống như trên; và đối chứng IV: kháng thể kháng EGFR thể khảm được bọc lộ trong bảng sáng chế Mỹ số 7,060,808. (□): Nội bào hóa diễn ra ở nhiệt độ 37°C; và (■): Nội bào hóa diễn ra ở nhiệt độ 4°C.

Fig.4 thể hiện khả năng liên kết và nội bào hóa của kháng thể kháng EGFRvIII H1H1863N2(Fuc-) bởi các khối u B16F10.9 hoặc các khối u B16F10.9 biểu hiện EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII), được ghép ngoại lai trên chuột suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID). Kháng thể kháng EGFRvIII liên kết trên bề mặt tế bào (Fig.4a) hoặc gắn trên bề mặt tế bào cộng với nội bào hóa (Fig.4b) hoặc kháng thể đối chứng isotyp, được phát hiện bởi allophycocyanin liên hợp kháng thể kháng Fc người (hFc-APC) bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy. Cường độ huỳnh quang trung bình (MIF) ở 10 phút (□), 4 giờ (▨), và 24 giờ (■), sau khi tiêm kháng thể, được biểu thị.

Fig.5 thể hiện kết quả phân tích được động học của kháng thể kháng EGFRvIII H1H863N2(Fuc+) (Fig.5d) và các kháng thể đối chứng (đã được mô tả ở trên), tức là, đối chứng I (Fig.5b), đối chứng III (Fig.5c), và đối chứng IV (Fig.5a), ở chuột kiểu đại (●) hoặc chuột biểu hiện EGFR người (■).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi bắt đầu mô tả sáng chế, cần phải hiểu rằng, sáng chế này không bị giới hạn trong các điều kiện thử nghiệm và phương pháp cụ thể đã mô tả, các điều kiện và phương pháp có thể được thay đổi. Cũng cần hiểu rằng, các thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế chỉ được dùng với mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không bị giới hạn bởi phạm vi của sáng chế, chỉ bị giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có ý nghĩa giống với nghĩa hiểu thông thường bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “khoảng”, khi được sử dụng để tham chiếu đến các giá trị dạng số được trích dẫn cụ thể, có nghĩa là giá trị này có thể thay đổi không quá 1% so với giá trị trích dẫn. Ví dụ, như được sử dụng ở đây, khi diễn đạt “khoảng 100” tức là sẽ bao gồm giá trị 99 và 101 và tất cả các giá trị nằm giữa 99 và 101 (ví dụ, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4; v.v.).

Mặc dù bất kỳ phương pháp và vật liệu nào giống hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu mô tả ở đây có thể được sử dụng để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng các phương pháp và vật liệu đang được mô tả ở đây sẽ được ưu tiên hơn cả.

Định nghĩa

Thuật ngữ “EGFRvIII”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ biến thể nhóm III của EGFR người có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 147, hoặc mảnh có hoạt tính sinh học của nó, thể hiện mọi đặc tính đặc hiệu với EGFRvIII, thường trái ngược với đặc tính của EGFR biểu hiện bình thường, trừ khi được chỉ ra khác. EGFRvIII thiếu các gốc axit amin từ 6 đến 273 của EGFR trưởng thành (tức là, SED ID No.:146 mà không có peptit tín hiệu, tức là, các gốc 1-24) và chứa một gốc glyxin mới tại vị trí số 6 giữa gốc axit amin 5 và 274.

Tất cả các protein, polypeptit và đoạn protein được nhắc tới ở đây đều dùng để chỉ protein, polypeptit và mảnh protein ở người trừ khi được chỉ ra rõ ràng là protein,

polypeptit và mảnh protein của các loài không phải con người. Do đó, khi diễn đạt “EGFRvIII” có nghĩa là đang đề cập đến EGFRvIII người trừ khi được chỉ ra rõ ràng là EGFRvIII của các loài không phải của người, ví dụ, “EGFRvIII chuột”, “EGFRvIII khỉ”, v.v..

Như được sử dụng ở đây, khi diễn đạt “EGFRvIII biểu hiện trên bề mặt tế bào” nghĩa là một hoặc nhiều protein EGFRvIII, hoặc vùng ngoại bào của chúng được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trong điều kiện *in vitro* hoặc *in vivo*, sao cho ít nhất một phần của protein EGFRvIII được tiếp xúc với phía ngoại bào của màng tế bào và khớp được với phần liên kết kháng nguyên của kháng thể. “EGFRvIII biểu hiện trên bề mặt tế bào” bao gồm hoặc chỉ bao gồm protein EGFRvIII được biểu hiện trên bề mặt tế bào của tế bào thường biểu hiện protein EGFRvIII. Ngoài ra, “EGFRvIII biểu hiện trên bề mặt tế bào” bao gồm hoặc chỉ bao gồm protein EGFRvIII được biểu hiện trên bề mặt tế bào của tế bào thường không biểu hiện EGFRvIII người trên bề mặt của nó nhưng lại được thiết kế di truyền để biểu hiện EGFRvIII trên bề mặt.

Như được sử dụng ở đây, khi diễn đạt “kháng thể kháng EGFRvIII” bao gồm cả kháng thể hóa trị một có tính đặc hiệu đơn, cũng như kháng thể đặc hiệu kép gồm nhánh thứ nhất liên kết với EGFRvIII và nhánh thứ hai liên kết với kháng nguyên (đích) thứ hai, trong đó, nhánh kháng EGFRvIII bao gồm trình tự HCVR/LCVR hoặc CDR bất kỳ nêu trong Bảng 1. Khi diễn đạt “kháng thể kháng EGFRvIII” cũng bao gồm liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) chứa kháng thể kháng EGFRvIII hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên hợp với thuốc hoặc độc tố (tức là, chất gây độc tế bào). Khi diễn đạt “kháng thể kháng EGFRvIII” cũng bao gồm liên hợp kháng thể-nuclit phóng xạ (ARC) chứa kháng thể kháng EGFRvIII hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó liên hợp với nuclit phóng xạ.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là phân tử hoặc phức hợp phân tử liên kết với kháng nguyên bất kỳ chứa ít nhất một vùng quyết định bổ trợ (CDR) liên kết hoặc tương tác đặc hiệu với một kháng nguyên cụ thể (ví dụ, EGFRvIII). Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm các phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L), liên kết với nhau bằng các cầu nối disulfua, cũng như các multime của chúng (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt là HCVR hoặc V_H) và một vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm ba vùng, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi

chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt là LCVR hoặc V_L) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ bao gồm một vùng (C_L1). Vùng V_H và V_L còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định bổ trợ (CDR), xen giữa các vùng này là vùng ít biến đổi hơn, được gọi là các vùng sườn (FR). Mỗi V_H và V_L đều gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amin đến đầu carboxy theo trình tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác của sáng chế, vùng sườn FR của kháng thể kháng EGFRvIII (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) có thể tương đồng với trình tự dòng mầm người, hoặc có thể bị biến đổi một cách tự nhiên hay nhân tạo. Một chuỗi liên ứng axit amin có thể được xác định dựa vào phép phân tích từ phần này tới phần khác của hai hoặc nhiều CDR.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng ở đây, cũng bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên của phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ. Thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể, hay các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng ở đây, bao gồm các polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ được tìm thấy trong tự nhiên, thu được bằng enzym, được tổng hợp hoặc được thiết kế di truyền liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo một thành phức hợp. Các mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể có nguồn gốc từ, ví dụ, phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp như phân giải protein hoặc kỹ thuật di truyền tái tổ hợp bao gồm các thao tác và biểu hiện của ADN mã hóa cho vùng biến đổi hoặc tùy ý vùng hằng định của kháng thể. ADN như vậy là ADN đã biết và/hoặc có sẵn từ, ví dụ, các nguồn thương mại, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện thực khuẩn thể-kháng thể), hoặc được tổng hợp. ADN này có thể được giải trình tự hoặc thao tác bằng các kỹ thuật hóa học hoặc sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng biến đổi và/hoặc vùng hằng định thành cấu hình phù hợp, hoặc để đưa vào các codon, tạo gốc xystein, sửa đổi, thêm hoặc bớt các axit amin, v.v..

Các ví dụ không giới hạn về các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh $F(ab')_2$; (iii) mảnh Fd; (iv) mảnh Fv; (v) phân tử Fv chuỗi đơn (scFv); (vi) mảnh dAb; và (vii) đơn vị nhận biết tối thiểu bao gồm các gốc axit amin bất chước vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định bổ trợ (CDR) được phân lập, chẳng hạn như peptit CDR3), hoặc peptit ép buộc FR3-CDR3-FR4. Các

phân tử được thiết kế khác, như kháng thể đặc hiệu vùng, kháng thể một vùng, kháng thể mất vùng, kháng thể thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể thể hai, kháng thể thể ba, kháng thể thể bốn, kháng thể đơn, kháng thể có kích thước nano (ví dụ, kháng thể thể có kích thước nano hóa trị một, hóa trị hai, v.v.), được phẩm miễn dịch mô đun nhỏ (SMIP), vùng biến đổi của IgNAR (kháng thể từ máu cá mập), đều nằm trong thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên”, được sử dụng ở đây.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể thường chứa ít nhất một vùng biến đổi. Vùng biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và nhìn chung, thường chứa ít nhất một vùng CDR liên kề hoặc ở trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Các mảnh liên kết kháng nguyên chứa vùng V_H liên kết với vùng V_L , các vùng V_H và V_L có thể nằm tại vị trí tương đối với nhau theo một trình tự sắp xếp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể đối xứng hai bên và bao gồm các dime V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể bao gồm một monome vùng V_H hoặc V_L .

Theo các phương án nhất định, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể gồm ít nhất một vùng biến đổi liên kết đồng hóa trị với ít nhất một vùng hằng định. Không giới hạn, các cấu hình lấy làm ví dụ của vùng biến đổi và vùng hằng định có thể được tìm thấy trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; và (xiv) V_L - C_L . Trong cấu hình bất kỳ của vùng biến đổi và vùng hằng định, bao gồm các cấu hình lấy làm ví dụ bất kỳ được trình bày ở trên, vùng biến đổi và vùng hằng định đều có thể liên kết trực tiếp với một vùng khác hoặc có thể liên kết với toàn bộ hoặc một phần của vùng bản lề hoặc vùng liên kết. Vùng bản lề có thể chứa ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều) axit amin tạo ra liên kết linh hoạt hay bán linh hoạt giữa vùng biến đổi hoặc vùng hằng định liên kề trong một phân tử polypeptit duy nhất. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể là đồng dime hoặc dị dime (hoặc multime) trong cấu hình của vùng biến đổi và vùng hằng định bất kỳ được trình bày ở trên trong liên kết phi hóa trị với một dime khác và/hoặc với một hoặc nhiều monome vùng V_H hoặc V_L (ví dụ, bằng (các) cầu nối disulfua).

Tương tự như với phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ, mảnh liên kết kháng

nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thường chứa ít nhất hai vùng biến đổi khác nhau, trong đó mỗi vùng biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên riêng biệt hoặc với epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên. Bất kỳ định dạng kháng thể đa đặc hiệu nào, bao gồm các định dạng kháng thể đặc hiệu kép lấy làm ví dụ được bộc lộ ở đây, có thể được biến đổi để sử dụng trong phạm vi mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật.

Kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng thông qua tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) hoặc gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). “Tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể” (CDC) đề cập đến khả năng ly giải tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng kháng thể theo sáng chế khi có mặt bổ thể. “Tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể” (ADCC) đề cập đến phản ứng trung gian tế bào, trong đó, tế bào gây độc không đặc hiệu là các tế bào biểu hiện thụ thể Fc (FcR) (ví dụ, tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) nhận diện kháng thể gắn trên bề mặt tế bào đích từ đó ly giải tế bào đích. Có thể đo CDC và ADCC sử dụng các thử nghiệm đã biết và có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ các số 5,500,362 và 5,821,337, và Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:652-656). Vùng hằng định của kháng thể có vai trò quan trọng trong chức năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể và gây độc tế bào phụ thuộc trung gian của kháng thể. Vì vậy, tiêu chí lựa chọn isotyp của kháng thể dựa vào liệu có muốn kháng thể gây độc trung gian tế bào.

Theo phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế là kháng thể người. Thuật ngữ “kháng thể người” được sử dụng ở đây, bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Kháng thể người theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người (ví dụ, đột biến được gây ra bởi đột biến ngẫu nhiên hoặc tại vị trí cụ thể trong điều kiện *in vitro* hoặc bởi đột biến soma trong điều kiện *in vivo*), ví dụ trong các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể người”, như được sử dụng ở đây, không được dự tính để bao gồm kháng thể trong đó trình tự vùng CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột, được ghép vào trình tự khung của người.

Kháng thể theo sáng chế có thể, trong một số phương án, là kháng thể người tái tổ hợp. Thuật ngữ “kháng thể người tái tổ hợp”, như được sử dụng ở đây, dự định bao gồm tất cả các kháng thể người được xử lý, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương pháp tái tổ hợp, chẳng hạn như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ (mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người tái tổ hợp (mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) được chuyển gen globulin miễn dịch người (tham khảo, ví dụ, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) hoặc các kháng thể được xử lý, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương pháp bất kỳ khác bao gồm việc nối trình tự gen globulin miễn dịch người vào trình tự ADN khác. Các kháng thể người tái tổ hợp này có vùng biến đổi hoặc vùng hằng định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, kháng thể người tái tổ hợp này trải qua đột biến *in vitro* (hoặc, khi chuyển gen động vật vào trình tự Ig bằng việc gây đột biến soma trong điều kiện *in vivo*) và vì vậy trình tự axit amin của vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là trình tự có nguồn gốc và có liên quan đến trình tự V_H và V_L dòng mầm người, có thể không tồn tại tự nhiên trong danh mục dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Kháng thể người có thể tồn tại ở hai dạng được liên hợp với vùng bản lề không thuần nhất. Ở một dạng, phân tử globulin miễn dịch bao gồm cấu trúc bốn chuỗi ổn định có khối lượng xấp xỉ 150-160 kDa, trong đó các dime được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua chuỗi nặng liên chuỗi. Ở dạng thứ hai, các dime không được liên kết bằng liên kết disulfua liên chuỗi và phân tử có khối lượng khoảng 75-80 kDa được tạo ra từ một cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đồng hóa trị (một nửa kháng thể). Các dạng này rất khó phân tách, ngay cả sau khi tinh sạch ái lực.

Tần suất xuất hiện của dạng thứ hai trong các isotyp IgG có chiều dài đầy đủ khác nhau là do, nhưng không giới hạn ở, sự khác biệt về cấu trúc kết hợp với isotyp vùng bản lề của kháng thể. Việc thay thế một axit amin trong vùng bản lề của vùng bản lề IgG4 người có thể làm giảm đi đáng kể tần suất xuất hiện của dạng thứ hai (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) tới mức thường thấy bằng cách sử dụng vùng bản lề IgG1 người. Sáng chế bao gồm các kháng thể có một hoặc nhiều đột biến tại vùng bản lề, C_H2 hoặc C_H3 là những vùng mong muốn, ví dụ, trong sản

xuất, để cải thiện hiệu suất của dạng kháng thể mong muốn.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể được phân lập. Thuật ngữ “kháng thể được phân lập” được sử dụng ở đây dùng để chỉ các kháng thể được nhận biết và phân tách và/hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần thuộc môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể được tách hoặc lấy ra từ ít nhất một phần của một cơ quan hoặc từ mô hoặc tế bào, trong đó, kháng thể tồn tại một cách tự nhiên hoặc được sản xuất một cách tự nhiên, là một “kháng thể được phân lập” cho mục đích của sáng chế. Kháng thể được phân lập cũng bao gồm kháng thể tại chỗ (*in situ*) trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể được phân lập là kháng thể đã trải qua ít nhất một bước tinh sạch hoặc phân lập. Theo các phương án nhất định, kháng thể được phân lập về cơ bản không chứa các chất hóa học và/hoặc vật liệu tế bào khác.

Kháng thể kháng EGFRvIII được mô tả ở đây có thể gồm một hoặc nhiều đột biến thay thế, thêm và/hoặc mất axit amin tại vùng sườn và/hoặc vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với trình tự dòng mầm tương ứng tại nơi sinh ra các kháng thể. Các đột biến này có thể dễ dàng xác định được bằng cách so sánh trình tự axit amin mô tả ở đây với trình tự dòng mầm có sẵn từ, ví dụ, trong kho dữ liệu trình tự kháng thể đã được công khai. Sáng chế bao gồm các kháng thể, và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó có nguồn gốc từ trình tự axit amin bất kỳ được mô tả ở đây, trong đó, một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng sườn và/hoặc vùng CDR bị đột biến với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ đó hoặc với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm người, hoặc đột biến thay thế axit amin bảo thủ của (các) gốc dòng mầm tương ứng (thay đổi trình tự này được gọi chung là “đột biến dòng mầm”). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, bắt đầu với trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ ở đây, có thể dễ dàng sản xuất một lượng lớn Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm hoặc tổ hợp các đột biến. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc của vùng sườn và/hoặc vùng CDR trong vùng V_H và/hoặc V_L được đột biến quay trở lại các gốc trong trình tự dòng mầm ban đầu là nơi mà kháng thể được sinh ra. Theo các phương án khác, chỉ những gốc nhất định được đột biến quay trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1, hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc đột biến được tìm thấy ở CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các

phương án khác, một hoặc nhiều gốc ở vùng sườn và/hoặc vùng CDR bị đột biến thành các gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác (tức là, một trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm sinh ra kháng thể). Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hay nhiều đột biến dòng mầm tại vùng sườn và/hoặc vùng CDR, ví dụ, các gốc riêng lẻ nhất định bị đột biến thành gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể, trong khi các gốc nhất định khác có khác biệt với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc được đột biến thành gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác. Sau khi thu hồi, các Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ dàng được kiểm tra một hoặc nhiều thuộc tính mong muốn như: cải thiện tính đặc hiệu liên kết, tăng ái lực liên kết, cải thiện hoặc tăng cường các đặc tính đối vận hay đồng vận (như trường hợp có thể), giảm tính sinh miễn dịch, v.v.. Các kháng thể và đoạn liên kết kháng nguyên thu được theo cách này, được bộc lộ trong sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng EGFRvIII có chứa các biến thể của bất kỳ trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR nào được bộc lộ ở đây có một hoặc nhiều sự thay thế bảo thủ. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII có trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR với, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v., các đột biến thay thế axit amin bảo thủ liên quan đến các trình tự axit amin HCVR/LCVR và/hoặc CDR bất kỳ được trình bày trong Bảng 1 ở đây.

Thuật ngữ “epitop” dùng để chỉ vị trí quyết định kháng nguyên, là vị trí tương tác với một vị trí liên kết kháng nguyên cụ thể trên vùng biến đổi của phân tử kháng thể, được gọi là paratop. Một phân tử kháng nguyên có thể có nhiều hơn một epitop. Vì vậy, các kháng thể khác nhau có thể gắn vào các vùng khác nhau trên cùng một kháng nguyên và có thể có những tác động sinh học khác nhau. Epitop có thể tồn tại ở dạng cấu hình không gian hoặc ở dạng thẳng. Epitop dạng cấu hình không gian được tạo ra bởi các axit amin nằm cạnh nhau trong không gian từ các đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit thẳng. Epitop dạng thẳng được tạo ra từ các gốc axit amin liền kề trong chuỗi polypeptit. Trong trường hợp nhất định, epitop có thể chứa các cấu tử của phức hợp saccarit, nhóm photphoryl, hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Thuật ngữ “gần như tương đồng” hoặc “về cơ bản tương đồng” được dùng khi đề cập đến axit nucleic hoặc mảnh của nó, chỉ ra rằng, khi sắp thẳng hàng một cách tối

ưu đột biến thêm hoặc mất nucleotit thích hợp với axit nucleic khác (hoặc sợi bổ sung của nó), thì độ tương đồng trình tự nucleotit ít nhất khoảng 95%, và tốt hơn là ít nhất khoảng 96%, 97%, 98%, và 99% của các cặp bazơ nucleotit như được đo bằng bất kỳ thuật toán đã biết về tương đồng trình tự như FASTA, BLAST hoặc Gap, sẽ được thảo luận dưới đây. Phân tử axit nucleic gần như tương đồng với phân tử axit nucleic tham chiếu có thể, trong một số trường hợp nhất định, mã hóa cho chuỗi polypeptit có trình tự axit amin giống hoặc về cơ bản tương tự chuỗi polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Đối với polypeptit, thuật ngữ “gần như tương tự” hoặc “về cơ bản tương tự” có nghĩa là hai chuỗi peptit, khi xếp thẳng hàng một cách tối ưu nhất, bằng các chương trình như GAP hay BESTFIT sử dụng trọng lượng khoảng trống mặc định, tìm ra được độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, và thậm chí là ít nhất khoảng 96%, 97%, 98%, và 99%. Tốt hơn nếu, vị trí các gốc không khác biệt tương đồng bởi việc thay thế axit amin bảo thủ. “Thay thế axit amin bảo thủ” là một gốc axit amin này được thay thế bởi một gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) với các đặc điểm hóa học tương tự (ví dụ, mang điện tích hoặc kỵ nước). Nhìn chung, việc thay thế axit amin bảo thủ về cơ bản không làm thay đổi các đặc điểm chức năng của protein. Trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau do việc thay thế bảo thủ, phần trăm trình tự tương đồng hay độ tương đồng có thể được điều chỉnh lên cho đúng với tính chất bảo thủ của việc thay thế. Các phương pháp điều chỉnh là các phương pháp đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Tham khảo, ví dụ, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các ví dụ về các nhóm axit amin có chuỗi bên với các thuộc tính hóa học tương tự bao gồm (1) các chuỗi bên aliphatic: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) các chuỗi bên aliphatic-hydroxyl: serin và threonin; (3) các chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) các chuỗi bên aromatic: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) các chuỗi bên tính bazơ: lyxin, arginin, và histidin; (6) các chuỗi bên tính axit: aspartat và glutamat, và (7) các chuỗi bên chứa lưu huỳnh là xystein và metionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo thủ được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Ngoài ra, thay thế bảo thủ là bất kỳ sự thay đổi nào có giá trị dương trong ma trận log-likelihood PAM250 được bộc lộ trong Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256:

1443-1445, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Thay thế “khả bảo thủ” là bất kỳ sự thay đổi nào có giá trị không âm trong ma trận log-likelihood PAM250.

Độ tương tự hay độ tương đồng của polypeptit, thường được đo bằng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein ghép các trình tự giống nhau sử dụng các phương pháp đo độ tương tự gán cho việc thay thế, cắt bỏ hoặc các biến đổi khác, bao gồm việc thay thế axit amin bảo thủ. Ví dụ, phần mềm GCG bao gồm các chương trình như Gap và Bestfit, các phần mềm này có thể được sử dụng với tham số mặc định để xác định độ tương đồng trình tự hoặc độ đồng nhất trình tự giữa các polypeptit gần gũi, như các polypeptit tương đồng từ các loài khác nhau của sinh vật hoặc giữa protein kiểu đại và biến thể của nó. Tham khảo, ví dụ, GCG ver.6.1. Các chuỗi polypeptit cũng có thể được so sánh với nhau bằng FASTA sử dụng tham số mặc định hoặc tham số được đề xuất, một chương trình trong GCG ver.6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp các sắp xếp và phần trăm tương đồng của vùng xếp chồng khớp nhất giữa trình tự truy vấn và trình tự tìm kiếm (Pearson (2000) *supra*). Thuật toán khác được ưu tiên sử dụng hơn khi so sánh một trình tự theo sáng chế với một cơ sở dữ liệu có chứa một lượng lớn trình tự từ các sinh vật khác nhau là phần mềm BLAST, đặc biệt là BLASTP và TBLASTN, sử dụng các tham số mặc định. Tham khảo, ví dụ, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH. Ví dụ, kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế có thể có khả năng liên kết với EGFRvII tại pH axit giảm đi so với khả năng liên kết tại pH trung tính. Tương tự, kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế có thể có khả năng liên kết với EGFRvIII ở pH axit tăng lên so với khả năng liên kết tại pH trung tính. Khi diễn đạt “pH axit” bao gồm các giá trị pH nhỏ hơn 6,2, ví dụ, khoảng 6,0; 5,95; 5,9; 5,85; 5,8; 5,75; 5,7; 5,65; 5,6; 5,55; 5,5; 5,45; 5,4; 5,35; 5,3; 5,25; 5,2; 5,15; 5,1; 5,05; 5,0; hoặc thấp hơn. Như được sử dụng ở đây, diễn đạt “pH trung tính” có nghĩa là độ pH khoảng 7,0 đến khoảng 7,4. Diễn đạt “pH trung tính” bao gồm các giá trị pH khoảng 7,0; 7,05; 7,1; 7,15; 7,2; 7,25; 7,3; 7,35; và 7,4.

Trong một số trường hợp nhất định, “khả năng liên kết với EGFRvIII ở pH axit

giảm đi so với pH trung tính” được thể hiện ở tỉ số giữa giá trị K_D của kháng thể liên kết với EGFRvIII tại pH axit và giá trị K_D của kháng thể liên kết với EGFRvIII tại pH trung tính (hoặc ngược lại). Ví dụ, kháng thể hay mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được coi là “giảm khả năng liên kết với EGFRvIII tại pH axit so với pH trung tính” nếu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có tỷ số K_D axit/trung tính khoảng 3,0 hoặc lớn hơn. Theo các phương án lấy làm ví dụ nhất định, tỉ số K_D axit/trung tính của một kháng thể hay mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có giá trị khoảng 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5; 13,0; 13,5; 14,0; 14,5; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 100,0 hoặc lớn hơn.

Các kháng thể có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH có thể thu được, ví dụ, bằng cách sàng lọc quần thể các kháng thể biểu hiện giảm (hoặc tăng) khả năng liên kết với một kháng nguyên cụ thể tại pH axit so với pH trung tính. Ngoài ra, những biến đổi ở mức độ axit amin tại vùng liên kết với kháng nguyên giúp thu được các kháng thể có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH. Ví dụ, bằng việc thay thế một hoặc nhiều axit amin tại vùng liên kết với kháng nguyên (ví dụ, như vùng CDR) bằng một gốc histidin, có thể thu được kháng thể với khả năng liên kết với kháng nguyên tại pH axit giảm so với khả năng liên kết tại pH trung tính.

Kháng thể kháng EGFRvIII chứa biến thể Fc

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng EGFRvIII được đề cập có chứa miền Fc gồm một hoặc nhiều đột biến giúp tăng hoặc giảm khả năng liên kết của kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, tại pH axit so với pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng EGFRvIII bị đột biến tại vùng CH_2 hoặc CH_3 của miền Fc, trong đó đột biến làm tăng ái lực giữa vùng Fc và FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong thể nhân nơi có pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Các đột biến đã nêu làm tăng chu kỳ bán rã trong huyết thanh của kháng thể khi cung cấp cho động vật. Các ví dụ không giới hạn về các biến đổi tại miền Fc đã nêu bao gồm, ví dụ, biến đổi tại vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T), và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc biến đổi ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, A, W, H, F hoặc Y [N434W, N434W, N434H, N434F hoặc N434Y]); hoặc biến đổi tại vị trí 250

và/hoặc 428; hoặc biến đổi ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, quá trình biến đổi bao gồm một biến đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); một biến đổi 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); một biến đổi 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); một biến đổi 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); một biến đổi 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và một biến đổi 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P). Theo phương án khác, quá trình biến đổi bao gồm một biến đổi 265A (ví dụ, D265A) và/hoặc 297A (ví dụ, N297A).

Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII có miền Fc chứa một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm các đột biến được chọn từ nhóm bao gồm: 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L); 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E); 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); 257I và 311I (ví dụ, P257I và Q311I); 257I và 434H (ví dụ, P257I và N434H); 376V và 434H (ví dụ, D376V và N434H); 307A, 380A và 434A (ví dụ, T307A, E380A và N434A); và 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F). Tất cả các tổ hợp có thể xảy ra của các đột biến tại miền Fc đã nêu, và các đột biến khác tại vùng biến đổi của kháng thể được bộc lộ ở đây, đã được định trước trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng EGFRvIII gồm một vùng hằng định chuỗi nặng (C_H) thể khảm, trong đó vùng C_H thể khảm có chứa các đoạn có nguồn gốc từ vùng C_H của một hoặc nhiều isotyp globulin miễn dịch. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng C_H thể khảm có một phần hoặc toàn bộ đoạn C_{H2} có nguồn gốc từ phân tử IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người, kết hợp với một phần hoặc toàn bộ đoạn C_{H3} có nguồn gốc từ phân tử IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế chứa một vùng C_H thể khảm có vùng bản lề thể khảm. Ví dụ, vùng bản lề thể khảm có thể bao gồm một trình tự axit amin “bản lề trên” (các gốc axit amin từ vị trí 216 đến 227 theo cách đánh số EU) có nguồn gốc từ một vùng bản lề IgG1 người, IgG2 người, và IgG4 người, kết hợp với một trình tự “bản lề dưới” (các gốc axit amin từ vị trí 228 đến 236 theo cách đánh số EU) có nguồn gốc từ vùng bản lề IgG1 người, IgG2 người, và IgG4 người. Theo các phương án nhất định, vùng bản lề thể khảm bao gồm các gốc axit amin có nguồn gốc từ vùng bản lề trên của IgG1 người, hoặc IgG4 người và các gốc axit amin có nguồn gốc từ vùng bản lề dưới của IgG2 người. Theo những phương án nhất định, kháng thể

có vùng C_H thể khả được mô tả ở đây có thể biểu hiện các chức năng phản ứng của Fc bị biến đổi mà không gây ảnh hưởng bất lợi đến các liệu pháp điều trị hoặc đặc tính dược động học của kháng thể (tham khảo, ví dụ, đơn sáng chế Mỹ Số 61/759,578, nộp ngày 1/2/2013, công bố trong tài liệu này được bộc lộ ở đây bằng cách tham chiếu đến toàn bộ).

Liên hợp kháng thể-thuốc (ADC)

Sáng chế đề cập đến liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) gồm một kháng thể kháng EGFRvIII hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên hợp với gốc trị liệu như chất gây độc tế bào, thuốc hóa trị, hoặc đồng vị phóng xạ.

Các chất gây độc tế bào bao gồm chất bất kỳ gây bất lợi cho khả năng phát triển, tồn tại và nhân lên của tế bào. Các ví dụ về chất gây độc tế bào và chất hóa trị thích hợp có thể liên hợp với kháng thể kháng EGFRvIII theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm, ví dụ, 1-(2-cloetyl)-1,2-dimetansulfonyl hydrazit, 1,8-dihydroxy-bicyclo[7.3.1]trideca-4,9-dien-2,6-diyne-13-one, 1-dehydrotestosteron, 5-fluorouracil, 6-mercaptapurin, 6-thioguanin, 9-amino camptothecin, actinomycin D, amanitin, aminopterin, anguidin, anthracyclin, anthramycin (AMC), auristatin, bleomycin, busulfan, axit butyric, calicheamicin, camptothecin, carminomycin, carmustin, cemadotin, cisplatin, colchicin, combretastatin, cyclophosphamid, cytarabin, cytochalasin B, dactinomycin, daunorubicin, decarbazin, diacetoxypentylidoxorubicin, dibromomannitol, dihydroxy anthracin dion, disorazoles, dolastatin, doxorubicin, duocarmycin, echinomycin, eleutherobin, emetin, epothilon, esperamicin, estramustin, ethidium bromit, etoposet, fluorouracil, geldanamycin, gramicidin D, glucocorticoid, irinotecan, leptomycin, leurosin, lidocain, lomustin (CCNU), maytansinoid, meclorethamin, melphalan, mercaptopurin, methopterin, methotrexate, mithramycin, mitomycin, mitoxantron, N8-acetyl spermidin, podophyllotoxin, procain, propranolol, pteridin, puromycin, pyrrolobenzodiazepin (PDB), rhizoxin, streptozotocin, tallysomycin, taxol, tenoposet, tetracain, thioepa clorambucil, tomaymycin, topotecan, tubulysin, vinblastin, vincristin, vindesin, vinorelbin, và các dẫn xuất của chúng. Theo các phương án nhất định, chất gây độc tế bào liên hợp với kháng thể kháng EGFRvIII là maytansinoid như DM1 hoặc DM4, dẫn xuất tomaymycin, hoặc dẫn xuất dolastatin. Các chất gây độc tế bào khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật được dự tính nằm trong phạm vi sáng chế, bao gồm, ví dụ, các độc tố protein như ricin, độc tố *C. difficile*,

ngoại độc tố pseudomonas, độc tố ricin, diphtheria, botulinum, bryodin, saporin, độc tố của cây thương lục Mỹ (nghĩa là, phytolectatoxin và phytolectigenin), và những độc tố khác được trình bày trong Sapra *et al.*, *Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138:452-469.

Sáng chế cũng đề xuất các liên hợp kháng thể-phóng xạ (ARC) bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII liên hợp với một hoặc nhiều nuclit phóng xạ. Các nuclit phóng xạ lấy làm ví dụ có thể được sử dụng ở đây trong phạm vi của khía cạnh theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ, ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{186}Re , ^{227}Th , ^{222}Rn , ^{223}Ra , ^{224}Ra , và ^{90}Y .

Theo các phương án nhất định của sáng chế, liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) được đề cập bao gồm kháng thể kháng EGFRvIII liên hợp với chất gây độc tế bào (ví dụ, các chất gây độc tế bào bất kỳ được nêu ở trên) thông qua một phân tử liên kết. Mọi phân tử liên kết hoặc kỹ thuật liên kết đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật đều có thể sử dụng để tạo ra hoặc cấu thành nên một ADC. Theo các phương án nhất định, liên kết là liên kết có thể cắt. Theo các phương án khác, liên kết là liên kết không thể cắt. Các liên kết lấy làm ví dụ có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế bao gồm, các liên kết chứa hoặc bao gồm, ví dụ, MC (6-maleimidocaproyl), MP (maleimidopropanoyl), val-cit (valin-citrullin), val-ala (valin-alanin), vùng dipeptit trong mỗi liên kết có thể cắt protaza, PAB (p-aminobenzyloxycarbonyl), SPP (N-Succinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoat), SMCC (N-Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1 carboxylat), SIAB (N-Succinimidyl (4-iodoacetyl)aminobenzoat), và các biến thể và tổ hợp của chúng. Các ví dụ khác về liên kết có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế được bộc lộ, ví dụ, trong bằng sáng chế Mỹ 7,754,681 và trong Ducry, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21:5-13, và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó, nội dung trong các tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu chúng trong toàn bộ.

Sáng chế bao gồm các ADC trong đó, liên kết kết nối kháng thể kháng EGFRvIII hoặc phân tử liên kết với kháng nguyên với thuốc hoặc chất gây độc tế bào thông qua liên kết tại một axit amin cụ thể trong phân tử kháng thể hoặc phân tử liên kết với kháng nguyên. Các axit amin lấy làm ví dụ dùng để gắn trong phạm vi sáng chế bao gồm, ví dụ, lysin (tham khảo, ví dụ, US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; công bố quốc tế WO

2005/089808; bằng sáng chế Mỹ US 5,714,586; US 2013/0101546; và US 2012/0585592), xystein (tham khảo, ví dụ, US 2007/0258987; công bố quốc tế WO 2013/055993; công bố quốc tế WO 2013/055990; công bố quốc tế WO 2013/053873; công bố quốc tế WO 2013/053872; công bố quốc tế WO 2011/130598; US 2013/0101546; và US 7,750,116), selenoxystein (tham khảo, ví dụ, công bố quốc tế WO 2008/122039; và Hofer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451-12456), formyl glycine (tham khảo, ví dụ, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, và Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), các axit amin phi tự nhiên (tham khảo, ví dụ, công bố quốc tế WO 2013/068874, và công bố quốc tế WO 2012/166559), và các axit amin tính axit (tham khảo, ví dụ, công bố quốc tế WO 2012/05982). Các liên kết cũng có thể liên hợp với một protein liên kết kháng nguyên thông qua liên kết với carbohydrat (tham khảo, ví dụ, US 2008/0305497, và Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130) và liên kết disulfide (tham khảo, ví dụ, công bố quốc tế WO 2013/085925, công bố quốc tế WO 2010/010324, công bố quốc tế WO 2011/018611, và Shaunak *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312-313).

Mọi phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để liên hợp phân tử hóa học với peptit, polypeptit hoặc các đại phân tử khác đều có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế để tạo ra một ADC kháng EGFRvIII như được mô tả ở đây. Phương pháp mẫu để liên hợp kháng thể-thuốc thông qua phân tử liên kết được trình bày trong ví dụ 12. Việc thay đổi phương pháp mẫu này sẽ được đánh giá cao bởi những người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật và đã được dự tính trong phạm vi của sáng chế.

Theo những phương án nhất định, sáng chế đề cập đến các ADC, trong đó kháng thể kháng EGFRvIII được mô tả ở đây (ví dụ, kháng thể được đặt tên H1H1863N2) liên hợp với thành phần phân tử liên kết-thuốc được trình bày trong công bố quốc tế WO2014/145090 (ví dụ, hợp chất “7”, cũng được đề cập ở đây là “M0026”), công bố trong tài liệu này được đưa vào đây bằng cách tham chiếu đến toàn bộ (cũng tham khảo ví dụ 12 ở đây).

Lập bản đồ Epitop và các kỹ thuật liên quan

Epitop liên kết với các kháng thể theo sáng chế có thể chứa một trình tự liên tiếp của 3 hoặc nhiều hơn (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) axit amin của protein EGFRvIII. Ngoài ra, epitop có thể chứa

phần lớn là các axit amin (hoặc trình tự axit amin) không liền kề của EGFRvIII. Theo một số phương án, epitop nằm ở trên hoặc gần vùng liên kết-phối tử của EGFRvIII. Theo những phương án khác, epitop nằm ở bên ngoài vùng liên kết-phối tử của EGFRvIII, ví dụ, nằm trên bề mặt EGFRvIII, nơi mà một kháng thể, khi gắn vào epitop này, không làm cản trở việc phối tử liên kết vào EGFRvIII.

Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII liên kết đặc hiệu với EGFRvIII (và không liên kết với EGFR), trong đó, kháng thể này có khả năng nhận diện peptit nối EGFRvIII (ví dụ, SEQ, ID số:148). Các kháng thể như vậy được đề cập ở đây như là “chất gắn kết với peptit nối”, “kháng thể liên kết với peptit EGFRvIII”, và tương tự. Theo các phương án khác, sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII liên kết đặc hiệu với EGFRvIII (và không liên kết với EGFR), trong đó, kháng thể này không thể nhận diện peptit nối EGFRvIII (ví dụ, không thể nhận diện peptit nối có SEQ ID No: 148, và/hoặc không nhận diện được peptit có SEQ ID No: 165). Các kháng thể như trên có thể được đề cập ở đây như là “chất gắn cấu dạng”, “chất gắn epitop cấu dạng EGFRvIII”, và tương tự.

Có thể sử dụng các kỹ thuật khác đã biết đối với những người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để xác định liệu một kháng thể “tương tác với một hay nhiều axit amin” trong chuỗi polypeptit hoặc protein. Kỹ thuật lấy làm ví dụ bao gồm, ví dụ, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như được mô tả trong *Antibodies*, Harlow và Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), phân tích đột biến quét alanin, phân tích thẩm tách peptit (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), và phân tích phân khả năng cắt peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt epitop, chiết epitop và biến đổi đặc tính hóa học của kháng nguyên cũng có thể được sử dụng (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Phương pháp khác có thể được sử dụng để nhận diện axit amin trong chuỗi polypeptit, trong các tương tác kháng thể, là phương pháp phát hiện trao đổi hydro/đoteri bằng khối phổ. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri bao gồm gắn nhãn đoteri vào protein cần quan tâm, sau đó gắn kháng thể với protein đã được gắn nhãn đoteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước để trao đổi hydro-đoteri xảy ra tại tất cả các gốc trừ các gốc được kháng thể bảo vệ (là những gốc có gắn nhãn đoteri còn lại). Sau khi phân ly kháng thể, protein đích được cắt bằng enzyme proteaza và phân tích khối phổ, do đó bộc lộ các gốc gắn nhãn đoteri tương ứng với các axit amin cụ thể trong

tương tác kháng thể. Tham khảo, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen và Smith (2001) *Anal. (Chem. 73:256A-265A*.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII liên kết với cùng một epitop như bất kỳ kháng thể mẫu nào được mô tả ở đây (ví dụ, các kháng thể chứa trình tự axit amin bất kỳ được trình bày trong Bảng 1 ở đây). Tương tự, sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII cạnh tranh nhau để liên kết với EGFRvIII trong bất kỳ kháng thể mẫu nào được mô tả ở đây (ví dụ, các kháng thể chứa trình tự axit amin bất kỳ được trình bày trong Bảng 1 ở đây).

Có thể dễ dàng xác định được liệu một kháng thể liên kết với cùng một epitop hay cạnh tranh để liên kết với epitop như kháng thể kháng EGFRvIII tham chiếu sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và được sử dụng ở đây làm ví dụ. Ví dụ, để xác định liệu kháng thể thử nghiệm có liên kết với cùng một epitop như kháng thể kháng EGFRvIII tham chiếu theo sáng chế hay không, kháng thể tham chiếu được liên kết với protein EGFRvIII. Bước tiếp theo là đánh giá khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử EGFRvIII. Nếu kháng thể thử nghiệm có khả năng liên kết với EGFRvIII khi kháng thể kháng EGFRvIII tham chiếu đã liên kết bão hòa thì có thể kết luận rằng, kháng thể thử nghiệm liên kết với một epitop khác so với kháng thể kháng EGFRvIII tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết với phân tử EGFRvIII khi kháng thể kháng EGFRvIII tham chiếu đã liên kết bão hòa thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng một epitop là epitop được liên kết với kháng thể kháng EGFRvIII tham chiếu trong sáng chế. Sau đó, các thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, đột biến peptit và phân tích liên kết) có thể được tiến hành để xác định liệu việc không quan sát thấy liên kết của kháng thể thử nghiệm trên thực tế là do chúng liên kết với cùng một epitop như kháng thể tham chiếu hay là do hiện tượng cản trở liên kết về mặt không gian (hoặc hiện tượng khác) là nguyên nhân khiến cho không quan sát được liên kết. Các thử nghiệm loại này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp như ELISA, RIA, Biacore, đếm tế bào theo dòng chảy hoặc bất kỳ các phương pháp định tính, hoặc định lượng liên kết-kháng thể khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo các phương án nhất định của sáng chế, hai kháng thể cùng liên kết (hoặc gộp lên nhau) vào một epitope nếu, ví dụ, vượt quá 1-, 5-, 10-, 20- hoặc 100- lần của một kháng thể sẽ ngăn cản liên kết của kháng thể còn lại ít nhất 50%, hơn nữa là 75%, 90% hoặc thậm chí 99%, các kết quả được đo

bằng thử nghiệm cạnh tranh liên kết (tham khảo, ví dụ, Junghans et al., Cancer Res.U 1990:50:1495-1502). Ngoài ra, hai kháng thể được coi là cùng liên kết với một epitop nếu các tất cả đột biến axit amin trong kháng nguyên, đột biến làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể cũng sẽ làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể còn lại. Hai kháng thể được coi là có ‘ các epitop gối lên nhau’ khi chỉ một nhóm nhỏ đột biến axit amin làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể có thể làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể còn lại.

Để xác định liệu một kháng thể có cạnh tranh để liên kết (hoặc cạnh tranh chéo để liên kết) với một kháng thể kháng EGFRvIII tham chiếu, phương pháp liên kết được mô tả ở trên được tiến hành theo hai hướng: Theo hướng thứ nhất, cho các kháng thể tham chiếu liên kết với protein EGFRvIII trong điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử EGFRvIII. Theo hướng thứ hai, cho kháng thể thử nghiệm liên kết với phân tử EGFRvIII trong điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử EGFRvIII. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ kháng thể (bão hòa) đầu tiên có khả năng liên kết với phân tử EGFRvIII thì kết luận rằng, kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh với nhau để gắn vào EGFRvIII. Như những người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá được, một kháng thể cạnh tranh để liên kết với một kháng thể tham chiếu có thể không cần liên kết với cùng một epitop như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể ngăn cản không gian liên kết của kháng thể tham chiếu bằng liên kết epitop xếp chồng hoặc liên kề.

Phương pháp tạo kháng thể người

Kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế có thể là kháng thể người có chiều dài đầy đủ. Các phương pháp để tạo ra kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể đơn dòng người có chiều dài đầy đủ đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập. Mọi phương pháp đã biết đều có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế để tạo ra kháng thể người liên kết đặc hiệu với EGFRvIII người.

Ví dụ, sử dụng công nghệ VELOCIMMUNETM, hoặc bất kỳ phương pháp tương tự đã biết khác để tạo kháng thể đơn dòng người có chiều dài đầy đủ và kháng thể thể khả ái lực cao với EGFRvIII, các kháng thể này bước đầu được phân lập có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột. Như trong mục thử nghiệm dưới đây, các đặc điểm và tiêu chí mong muốn để lựa chọn kháng thể bao gồm ái lực,

hoạt tính ngăn cản phối tử, tính chọn lọc, epitop, v.v.. Nếu cần thiết, vùng hằng định chuột sẽ được thay thế bằng vùng hằng định người mong muốn, ví dụ kháng thể kiểu đại hay IgG1 hoặc IgG4 được biến đổi, để tạo ra một kháng thể kháng EGFRvIII người có chiều dài đầy đủ. Trong khi vùng hằng định đã chọn có thể thay đổi tùy theo mục đích sử dụng cụ thể, thì các đặc tính đặc hiệu đích và liên kết với kháng nguyên ái lực cao lại thuộc về vùng biến đổi. Trong một số trường hợp nhất định, kháng thể kháng EGFRvIII người có chiều dài đầy đủ được phân lập trực tiếp từ tế bào B dương tính kháng nguyên.

Tương đương sinh học

Kháng thể kháng EGFRvIII và các mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm các protein có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của các kháng thể đã được mô tả nhưng giữ lại khả năng liên kết với EGFRvIII người. Các kháng thể và mảnh kháng thể biến đổi như trên bao gồm một hoặc nhiều đột biến thêm, mất, hoặc thay thế các axit amin khi so sánh với trình tự mẹ, nhưng biểu hiện hoạt tính sinh học về cơ bản tương đương với các kháng thể đã được mô tả. Tương tự, các trình tự ADN mã hóa cho kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế chứa một hoặc nhiều các đột biến thêm, mất, hoặc thay thế nucleotit khi so sánh với trình tự đã được bộc lộ, tuy nhiên các trình tự mã hóa cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể kháng EGFRvIII này về cơ bản tương đương sinh học với một kháng thể hoặc mảnh kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế. Các ví dụ về trình tự ADN và trình tự axit amin biến đổi được thảo luận ở trên.

Ví dụ, hai protein liên kết với kháng nguyên, hoặc kháng thể, được xem là tương đương sinh học nếu, chúng tương đương về dược lý hoặc thay thế dược lý mà tỉ lệ và phạm vi hấp thụ của chúng không có sự khác biệt rõ ràng khi cung cấp cùng liều mol phân tử dưới các điều kiện thử nghiệm giống nhau, hoặc khi cung cấp một liều hay nhiều liều. Một vài kháng thể sẽ được xem là tương đương hoặc thay thế dược lý nếu chúng tương đương về phạm vi hấp thụ nhưng không tương đương về tỉ lệ hấp thụ và chưa thể xem là tương đương sinh học bởi vì các khác biệt về tỉ lệ hấp thụ nêu trên là có chủ đích và được phản ánh qua quá trình gắn nhãn, các kháng thể này không cần thiết để đạt được nồng độ thuốc cơ thể hiệu quả, ví dụ, sử dụng thường xuyên, và được xem là không có ý nghĩa y học đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng không có khác biệt có ý nghĩa lâm sàng về độ an toàn, độ tinh sạch

và hiệu quả của chúng.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể chuyển đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu với sản phẩm sinh học mà không gây tăng nguy cơ tác dụng phụ có hại, bao gồm thay đổi có ý nghĩa lâm sàng trong sinh miễn dịch, hoặc làm giảm hiệu lực, khi so sánh với liệu pháp điều trị liên tục mà bệnh nhân không đổi thuốc như trên.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu cả hai protein đều hoạt động theo một cơ chế chung hoặc cơ chế hoạt động có điều kiện hay điều kiện sử dụng, trên phạm vi các cơ chế này đã được biết.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* hoặc *in vitro*. Các phương pháp đo mức độ tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác, trong đó nồng độ kháng thể hoặc chất chuyển hóa của nó trong máu, huyết tương, huyết thanh hoặc các dịch sinh học khác theo hàm theo gian; (b) thử nghiệm *in vitro* tương ứng với và phù hợp với dự đoán của các dữ liệu cơ sở sinh khả dụng *in vivo* của người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các loài động vật có vú khác, trong đó, hiệu quả được lý cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo theo hàm thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát tốt thiết lập độ an toàn, hiệu lực, hoặc sinh khả dụng hay tương đương sinh học của một kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của kháng thể kháng EGFRvIII trong sáng chế có thể được cấu thành bởi, ví dụ, tạo ra nhiều đột biến thay thế các gốc hay trình tự hoặc đột biến loại bỏ các gốc hay các trình tự ở đầu hoặc ở giữa không cần thiết đối với hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc cystein không cần cho hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc thay thế bằng các axit amin khác để ngăn cản sự hình thành các cầu disulfid nội phân tử không đúng hoặc không cần thiết khi hồi tính. Trong các phạm vi khác, kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể của kháng thể kháng EGFRvIII mà việc biến đổi axit amin dẫn đến làm thay đổi các đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, các đột biến loại bỏ hoặc di dời quá trình glycosyl hóa.

Tính chọn lọc loài và phản ứng chéo loài

Theo những phương án nhất định, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng EGFRvIII liên kết với EGFRvIII người nhưng không liên kết với EGFRvIII của các

loài khác. Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng EGFRvIII có khả năng liên kết với EGFRvIII người và EGFRvIII từ một hoặc nhiều loài không phải người. Ví dụ, các kháng thể kháng EGFRvIII của sáng chế có thể liên kết với EGFRvIII người và có thể gắn hoặc không gắn, như trong các trường hợp có thể, với một hoặc nhiều EGFRvIII của chuột, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ đuôi dài, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu hoặc tinh tinh. Theo những phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng EGFRvIII được đề cập có khả năng liên kết đặc hiệu với EGFRvIII người và EGFRvIII của khỉ đuôi dài (ví dụ, *Macaca fascicularis*). Các kháng thể kháng EGFRvIII khác theo sáng chế liên kết với EGFRvIII người nhưng không gắn, hoặc chỉ gắn yếu, với EGFRvIII khỉ lông dài.

Kháng thể đa đặc hiệu

Kháng thể theo sáng chế có thể đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Các kháng thể đa đặc hiệu có thể gắn đặc hiệu với các epitop khác nhau của chuỗi polypeptit đích hoặc có thể chứa các vùng liên kết với kháng nguyên đặc hiệu với nhiều hơn một chuỗi polypeptit đích. Tham khảo, ví dụ, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Các kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế có thể được liên kết với hoặc đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, với một peptit hoặc protein khác. Ví dụ, một kháng thể hoặc mảnh kháng thể của nó có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng khớp nối hóa học, dung hợp di truyền, liên hợp phi hóa trị hoặc bằng cách khác) với một hoặc nhiều phân tử, chẳng hạn một kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác để tạo ra một kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu với tính liên kết đặc hiệu thứ cấp.

Sáng chế bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép trong đó một cánh của globulin miễn dịch liên kết với EGFRvIII người, và cánh còn lại của globulin miễn dịch gắn đặc hiệu với một kháng nguyên thứ hai. Cánh liên kết với EGFRvIII gồm các trình tự axit amin HCVR/LCVR hoặc CDR bất kỳ được trình bày trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, cánh liên kết với EGFRvIII liên kết với EGFRvIII người và ngăn cản phối tử liên kết với EGFRvIII. Theo các phương án nhất định, cánh liên kết với EGFRvIII liên kết với EGFRvIII người nhưng không ngăn cản phối tử liên kết với EGFRvIII.

Định dạng kháng thể đặc hiệu kép có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế bao gồm việc sử dụng vùng globulin miễn dịch (Ig) C_H3 thứ nhất và vùng Ig C_H3

thứ hai, trong đó, các vùng Ig C_H3 thứ nhất và thứ hai khác các vùng khác tại ít nhất một axit amin, và trong đó sự khác biệt về ít nhất một axit amin làm giảm khả năng liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với Protein A so với một kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác biệt axit amin. Theo một phương án, vùng Ig C_H3 thứ nhất liên kết với Protein A và vùng Ig C_H3 thứ hai bao gồm một đột biến làm giảm hoặc mất liên kết với Protein A như biến đổi H95R (bằng phương pháp đánh số exon IMGT; biến đổi H435R bằng đánh số EU). Vùng C_H3 thứ hai còn chứa đột biến Y96F (bằng IMGT; Y436F bằng EU). Các đột biến khác có thể tìm thấy tại vùng C_H3 thứ hai gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (bằng IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (bằng IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I bởi EU) trong trường hợp của kháng thể IgG4. Các biến thể của kháng thể đặc hiệu kép được mô tả ở trên được dự tính trong phạm vi sáng chế.

Các định dạng đặc hiệu kép lấy làm ví dụ khác có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ví dụ, định dạng kháng thể đặc hiệu kép thể hai hoặc dựa vào scFv, dung hợp IgG-scFv, vùng điển đổi kép (DVD)-Ig, Quadroma, kỹ thuật bấm-vào-lỗ, chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường có bấm-vào-lỗ, v.v.), thể CrossMab, CrossFab, (SEED), khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG hoạt động kép, và các dạng đặc hiệu kép Mab² (tham khảo, ví dụ, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, và các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây, để xem xét lại các định dạng đã nêu). Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kết hợp axit nucleic/peptit, ví dụ, trong đó các axit nucleic phi tự nhiên với phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra các liên hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu vùng, sau đó chúng tự kết hợp thành phức hợp đa phân có thành phần, hóa trị và hình dạng xác định. (Tham khảo, ví dụ, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Bào chế và cung cấp được phẩm điều trị

Sáng chế đề xuất các dược phẩm có chứa kháng thể kháng EGFRvIII hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế với các chất mang, các tá dược, và các chất thích hợp khác giúp cải thiện khả năng di chuyển,

phát tán, chịu được thuốc và các đặc tính tương tự khác. Có vô số công thức thích hợp có thể được tìm thấy trong tuyển tập công thức và được tất cả nhà hóa dược biết đến như: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Những công thức này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, thạch, sáp, dầu, chất béo, chất béo (cationic hoặc anionic) gồm các túi (như LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), ADN liên hợp, bột nhão hấp thụ khan, hệ nhũ tương dầu-trong-nước và nước-trong-dầu, hệ nhũ tương cacbovac (chế phẩm polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, hỗn hợp bán rắn chứa cacbovac. Cũng tham khảo Briscoe CP et al. “Bản tóm tắt các tá dược dùng trong các công thức ngoài đường tiêu hóa” PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều kháng thể được cung cấp cho bệnh nhân có thể thay đổi tùy theo độ tuổi và kích thước cơ thể bệnh nhân, bệnh đích, tình trạng bệnh, đường dùng, và tương tự. Tốt hơn nếu, liều dùng được tính toán theo trọng lượng cơ thể hoặc diện tích bề mặt cơ thể. Ở bệnh nhân trưởng thành, việc tiêm kháng thể theo sáng chế vào tĩnh mạch có vẻ thuận lợi hơn, thông thường, một liều nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 20mg/kg trọng lượng cơ thể, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,02 đến 7, khoảng từ 0,03 đến 5, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05 đến 3 mg/kg trọng lượng cơ thể. Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh mà tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Liều trình và liều lượng để sử dụng hiệu quả kháng thể kháng EGFRvIII có thể được xác định bằng thực nghiệm; ví dụ, tiến triển bệnh của bệnh nhân có thể được theo dõi bằng cách đánh giá định kỳ, và cần điều chỉnh liều lượng sao cho phù hợp. Hơn nữa, việc chia tỉ lệ liều lượng khác loài có thể được tiến hành bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Nhiều hệ thống vận chuyển được biết đến và có thể sử dụng để cung cấp dược phẩm theo sáng chế, ví dụ, được đóng gói trong liposom, trong các hạt vi mô, viên nang siêu nhỏ, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virút đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (tham khảo, ví dụ, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Các phương pháp đưa dược phẩm vào cơ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm trong da, tiêm bắp, trong màng bụng, tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, qua đường mũi, gây tê ngoài mang cứng, và qua đường uống. Dược phẩm có thể được cung cấp theo bất kỳ con đường nào thuận tiện, ví dụ, bằng cách truyền hay tiêm thuốc, bằng cách

hấp thụ qua biểu mô hoặc lớp lót niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và đường ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với các chất hoạt hóa sinh học khác. Dược phẩm có thể được sử dụng cho toàn cơ thể hoặc cho từng cơ quan.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được tiêm dưới da hoặc tiêm tĩnh mạch bằng một ống tiêm và kim tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, liên quan đến việc tiêm dưới da, thiết bị đưa thuốc dạng bút được sử dụng để đưa dược phẩm theo sáng chế vào cơ thể bệnh nhân. Thiết bị đưa thuốc dạng bút có thể được tái sử dụng hoặc dùng một lần. Thiết bị đưa thuốc dạng bút tái sử dụng thường dùng một ống chứa dược phẩm có thể thay thế. Khi dược phẩm trong ống đã được sử dụng hết và chỉ còn ống trống, những ống trống này có thể dễ dàng loại bỏ và thay thế bằng một ống chứa dược phẩm mới. Thiết bị đưa thuốc dạng bút sau đó có thể tái sử dụng cho các lần sau. Đối với thiết bị đưa thuốc dạng bút dùng một lần thì không có ống thay thế. Thay vào đó, thiết bị đưa thuốc dạng bút dùng một lần đóng sẵn dược phẩm trong một chỗ chứa bên trong thiết bị. Một khi chỗ chứa đó hết dược phẩm thì toàn bộ thiết bị sẽ được loại bỏ.

Nhiều thiết bị đưa thuốc dạng bút tái sử dụng và dụng cụ tiêm tự động được sử dụng để tiêm dược phẩm trong sáng chế dưới da. Các ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly và Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), ở đây chỉ nêu tên một vài thiết bị. Các ví dụ về thiết bị đưa thuốc dạng bút dùng một lần được sử dụng để tiêm dược phẩm trong sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và dụng cụ tiêm tự động KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), bút PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), và HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), ở đây chỉ nêu tên một vài thiết bị.

Trong các tình huống nhất định, dược phẩm có thể được đưa vào trong một hệ thống phân phối kiểm soát. Theo một phương án, ống bơm có thể được sử dụng (tham khảo Langer, ở trên; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Theo một

phương án khác, các vật liệu polyme có thể được sử dụng; tham khảo, Medical Applications of Controlled Release, Langer và Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Theo một phương án khác, hệ thống phân phối kiểm soát có thể được đặt ở gần đích của dược phẩm, do đó chỉ đòi hỏi một phần nhỏ của liều hệ thống (tham khảo, ví dụ, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, ở trên, quyển 2, pp. 115-138). Các hệ thống phân phối kiểm soát khác được thảo luận trong bài đánh giá của Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Dược phẩm có thể tiêm bao gồm các dược phẩm dạng liều dùng cho tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, trong da và tiêm bắp hay dịch truyền nhỏ giọt, v.v.. Các dược phẩm tiêm này có thể được điều chế bằng các phương pháp công khai đã biết. Ví dụ, các dược phẩm tiêm có thể được điều chế bằng, ví dụ, bằng cách hòa tan, tạo huyền phù hoặc nhũ hóa các kháng thể hoặc muối của chúng được mô tả ở trên trong một môi trường nước vô trùng hoặc một môi trường dầu thường được sử dụng để tiêm. Các môi trường nước dùng để tiêm là, ví dụ, nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương có chứa glucosơ và các chất bổ trợ khác, v.v., chúng có thể được sử dụng kết hợp với một chất hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt phi ion [ví dụ, phức olyrsorbat 80, HCO-50 (polyoxyetylen (50 mol) sản phẩm cộng của dầu thầu dầu đã hydro hóa)], v.v.. Các môi trường chứa dầu được sử dụng là, ví dụ, dầu mè, dầu đậu tương, v.v., chúng có thể được sử dụng kết hợp với một chất hòa tan như enzoat, benzyl alcohol, v.v.. Vì thế dược phẩm tiêm được ưu tiên đựng vào trong một ống thuốc tiêm thích hợp.

Thuận lợi nếu, dược phẩm sử dụng theo đường uống hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả ở trên được bào chế thành dược phẩm dạng liều trong một liều đơn vị phù hợp với lượng các thành phần hoạt hóa. Liều đơn vị của dược phẩm dạng liều đã nêu bao gồm, ví dụ, các viên nén, viên tròn, viên nang, dung dịch tiêm (ống thuốc tiêm), thuốc đạn, v.v.. Lượng kháng thể đã nêu thường nằm trong khoảng từ 5 đến khoảng 500 mg trên mỗi liều đơn vị của dược phẩm dạng liều; đặc biệt ở dạng dung dịch tiêm, lượng kháng thể đã nêu thường nằm trong khoảng từ 5 đến khoảng 100mg và khoảng từ 10 đến khoảng 250 mg đối với các dược phẩm dạng liều khác.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa các kháng thể kháng EGFRvIII hoặc liên hợp kháng thể-thuốc chứa kháng thể kháng EGFRvIII (ví dụ, kháng thể kháng EGFRvIII hoặc ADC chứa bất kỳ trình tự HCVR/LCVR hoặc CDR nào được trình bày

trong Bảng 1). Dược phẩm điều trị có thể chứa kháng thể kháng EGFRvIII, mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc bất kỳ ADC nào được bộc lộ ở đây, và một chất mang được dùng hoặc chất độn.

Các kháng thể và ADC theo sáng chế rất hữu ích, không kể những cái khác, trong điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện tình trạng bệnh hoặc rối loạn bất kỳ liên quan đến hoặc trung gian bởi biểu hiện hoặc hoạt động của EGFRvIII, hoặc được điều trị bằng cách ngăn cản tương tác giữa EGFRvIII và một phối tử EGFR hoặc nếu không thì ngăn cản hoạt động và/hoặc tín hiệu của EGFRvIII, và/hoặc thúc đẩy nội bào hóa thụ thể và/hoặc giảm số lượng thụ thể trên bề mặt tế bào. Ví dụ, các kháng thể và ADC theo sáng chế rất hữu ích trong điều trị các khối u biểu hiện EGFRvIII và/hoặc có đáp ứng với tín hiệu trung gian-phối tử. Các Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể cũng được dùng để điều trị các khối u chưa di căn hoặc khối u di căn phát triển trong não và màng não, hầu huyệt, phổi và cây phế quản, đường tiêu hóa, đường sinh dục nam và nữ, cơ bắp, xương, da và các phần phụ, mô liên kết, lá lách, hệ thống miễn dịch, tế bào tạo máu và tủy xương, gan và đường tiết niệu, và các cơ quan cảm giác đặc biệt như mắt. Theo các phương án nhất định, kháng thể và ADC theo sáng chế được sử dụng để điều trị một hoặc nhiều bệnh ung thư sau: ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư biểu mô tuyến tụy, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến tiền liệt, u thần kinh đệm ác tính, ung thư xương ác tính, ung thư đại trực tràng, ung thư dạ dày (ví dụ, ung thư dạ dày với khuếch đại MET), u trung biểu mô ác tính, đa u tủy xương, ung thư buồng trứng, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư phổi không tế bào nhỏ, sarcoma mô mềm, ung thư tuyến giáp, ung thư vú, hoặc khối u ác tính.

Trong phạm vi của các dược phẩm điều trị được mô tả ở đây, kháng thể kháng EGFRvIII có thể được cung cấp như một liệu pháp điều trị riêng lẻ (tức là, chỉ có một chất điều trị duy nhất) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị khác (các ví dụ về các tác nhân điều trị này sẽ được mô tả ở nơi khác trong tài liệu này).

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các dược phẩm dùng trong điều trị ung thư, giảm sự phát triển của khối u và/hoặc làm suy giảm khối u ở bệnh nhân. Các dược phẩm này bao gồm một liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) thứ nhất dùng riêng lẻ hoặc dùng kết hợp với kháng thể kháng EGFRvIII hoặc ADC thứ hai. ADC thứ nhất thường chứa một kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể và một chất gây độc tế bào, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của ADC

thứ nhất liên kết đặc hiệu với EGFRvIII nhưng không liên kết với peptit nối EGFRvIII có SEQ ID No: 148 hoặc peptit có SEQ ID No: 165 (tức là, ADC thứ nhất chứa một kháng thể liên kết với EGFRvIII cấu dạng). Theo phương án mà trong đó kháng thể hoặc ADC thứ hai được cung cấp, kháng thể hoặc ADC thứ hai thường chứa một kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể và một chất gây độc tế bào, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với peptit nối EGFRvIII có SEQ ID No: 148 và/hoặc peptit có SEQ ID No: 165 (tức là, kháng thể hoặc ADC thứ hai chứa một kháng thể liên kết với peptit nối EGFRvIII). Trong các phương án nhất định, khi hai ADC kháng EGFRvIII riêng biệt được sử dụng trong phạm vi khía cạnh này của sáng chế, cả hai ADC có thể chứa cùng một chất gây độc hoặc cùng một lớp chất gây độc. Theo các phương án khác, khi hai ADC kháng EGFRvIII riêng biệt được sử dụng, mỗi ADC có thể chứa một chất gây độc khác nhau và/hoặc lớp chất gây độc khác nhau. Các phương án lấy làm ví dụ không giới hạn trong khía cạnh này của sáng chế được trình bày ở đây trong ví dụ 14. Theo như các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của ADC thứ nhất (tức là, kháng thể gắn EGFRvIII cấu dạng) bao gồm các vùng quyết định bổ trợ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có SEQ ID No: : 36, 38, 40, 44, 46, và 48, hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng có SEQ ID No: 34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SEQ ID No: 42.

Dược phẩm và liệu pháp kết hợp

Sáng chế đề xuất các thành phần và dược phẩm điều trị chứa kháng thể kháng EGFRvIII bất kỳ được mô tả ở đây kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa điều trị bổ sung, và các phương pháp cung cấp dạng kết hợp đã nêu cho đối tượng cần điều trị.

Các kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế có thể đồng công thức và/hoặc được cung cấp dưới dạng kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa điều trị bổ sung được lựa chọn từ nhóm bao gồm: chất đối kháng PRLR (ví dụ, một kháng thể kháng PRLR hoặc chất ức chế phân tử nhỏ của PRLR), chất đối kháng EGFR (ví dụ, kháng thể kháng EGFR [ví dụ, cetuximab hoặc panitumumab] hoặc chất ức chế phân tử nhỏ của EGFR [ví dụ, gefitinib hoặc erlotinib]), chất đối kháng của thành viên họ EGFR khác như Her2/ErbB2, ErbB3 hoặc ErbB4 (ví dụ, kháng thể kháng ErbB2 [ví dụ, trastuzumab hoặc T-DM1 {KADCYLA®}], kháng thể kháng ErbB3 hoặc kháng ErbB4 hoặc chất ức chế phân tử nhỏ ức chế hoạt động của ErbB2, ErbB3 hoặc ErbB4),

chất đối kháng cMET (ví dụ, kháng thể kháng cMET), chất đối kháng IGF1R (ví dụ, kháng thể kháng IGF1R), chất ức chế B-raf (ví dụ, vemurafenib, sorafenib, GDC-0879, PLX-4720), chất ức chế PDGFR- α (ví dụ, kháng thể kháng PDGFR- α), chất ức chế PDGFR- β (ví dụ, kháng thể kháng PDGFR- β hoặc chất ức chế kinaza phân tử nhỏ như, ví dụ, imatinib mesylat hoặc sunitinib malat), chất ức chế phối tử PDGF (ví dụ, kháng thể kháng PDGF-A, -B, -C, hoặc -D, aptamer, siRNA, v.v.), chất đối kháng VEGF (ví dụ, VEGF-bẫy như aflibercept, tham khảo, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ US 7,087,411 (cũng được đề cập ở đây như là “protein dung hợp ức chế VEGF”), kháng thể kháng VEGF (ví dụ, bevacizumab), chất ức chế kinaza phân tử nhỏ của thụ thể VEGF (ví dụ, sunitinib, sorafenib hoặc pazopanib), chất đối kháng DLL4 (ví dụ, kháng thể kháng DLL4 được bộc lộ trong đơn sáng chế Mỹ US 2009/0142354 như REGN421), chất đối kháng Ang2 (ví dụ, kháng thể kháng Ang2 được bộc lộ trong đơn sáng chế Mỹ US 2011/0027286 như H1H685P), chất đối kháng FOLH1 (ví dụ, kháng thể kháng FOLH1), chất đối kháng STEAP1 hoặc STEAP2 (ví dụ, kháng thể kháng STEAP1 hoặc kháng thể kháng STEAP2), chất đối kháng TMPRSS2 (ví dụ, kháng thể kháng TMPRSS2), chất đối kháng MSLN (ví dụ, kháng thể kháng MSLN), chất đối kháng CA9 (ví dụ, kháng thể kháng CA9), chất đối kháng uroplakin (ví dụ, kháng thể kháng uroplakin [ví dụ, kháng UPK3A]), chất đối kháng MUC16 (ví dụ, kháng thể kháng MUC16), chất đối kháng kháng nguyên Tn (ví dụ, kháng thể kháng Tn), chất đối kháng CLEC12A (ví dụ, kháng thể kháng CLEC12A), chất đối kháng TNFRSF17 (ví dụ, kháng thể kháng TNFRSF17), chất đối kháng LGR5 (ví dụ, kháng thể kháng LGR5), kháng thể kháng CD20 hóa trị một (ví dụ, kháng thể kháng CD20 hóa trị một như antibody rituximab), kháng thể PD-1, kháng thể PD-L1, kháng thể CD3, kháng thể CTLA-4, v.v.. Các chất khác có thể được dùng một cách hiệu quả khi kết hợp với các phân tử liên kết với kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế, ví dụ, tamoxifen, chất ức chế aromataza, và chất ức chế cytokin, bao gồm các chất ức chế cytokin phân tử nhỏ và các kháng thể liên kết với cytokin như IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, hoặc với các thụ thể tương ứng của chúng.

Sáng chế bao gồm các thành phần và được phẩm điều trị chứa các kháng thể kháng EGFRvIII bất kỳ được mô tả ở đây kết hợp với một hoặc nhiều chất hóa trị khác. Ví dụ về các chất hóa trị bao gồm các chất alkyl hóa như thiotepea và cyclophosphamid (CytosanTM); alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và

piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenemelamin, trietylenephosphoramit, triethylthiophosphaoramit và trimetylolomelamin; nitrogen cây mù tạc như clorambucil, clornaphazin, colophosphamit, estramustin, ifosfamid, meclorethamin, meclorethamin oxit hydroclorit, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, uracil cây mù tạc; các nitrosurea như carmustin, clorozotocin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; các chất kháng sinh như aclacinomysin, actinomycin, authramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, calicheamicin, carabycin, carminomycin, carzinophilin, cromomycin, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucin, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycin, axit mycophenolic, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; các chất chống chuyển hóa như methotrexat và 5-fluorouracil (5-FU); các chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptapurin, thiamiprin, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin như ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; các androgen như calusteron, dromostanolon propionat, epitioestan, mepitioestan, testolacton; các chất kháng adrenal như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; các chất đệm axit folic như axit frolinic; aceglaton; aldophosphamid glycosit; axit aminolevulinic; amsacrin; bestrabucil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolcin; diaziquon; elfornithin; elliptinium acetat; etoglucit; gallium nitrat; hydroxyurea; lentinan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubicin; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; PSK™; razoxan; sizofiran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2',2''-trichlorotrietylamin; urethan; vindesin; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosin; arabinosit ("Ara-C"); cyclophosphamid; thiotepa; taxan, ví dụ paclitaxel (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) và docetaxel (Taxotere™, Aventis Antony, France); clorambucil; gemcitabin; 6-thioguanin; mercaptapurin; methotrexat; các chất tương tự platinum như cisplatin và carboplatin; vinblastin; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamid; mitomycin C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposit; daunomycin;

aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; difluorometylornithin (DMFO); axit retinoic; esperamicin; capecitabin; và muối được dụng, các axit hoặc các dẫn xuất của chúng. Cũng bao gồm trong định nghĩa này là các chất kháng nội tiết tố đóng vai trò điều hòa hoặc ức chế hoạt động hormon lên khối u như kháng estrogen bao gồm, ví dụ, tamoxifen, raloxifen, aromataza ức chế 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY 117018, onapriston, và toremifen (Fareston); và kháng androgen như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; và các axit, muối được dụng hoặc các dẫn xuất bất kỳ của chúng.

Các kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế có thể cũng được cung cấp và/hoặc đồng cung cấp dưới dạng kết hợp với thuốc kháng virút, thuốc kháng sinh, thuốc giảm đau, corticosteroid, steroid, oxy, chất chống oxy hóa, chất ức chế COX, thuốc bảo vệ tim mạch, chelate kim loại, IFN-gamma, và/hoặc NSAID.

(Các) thành phần hoạt hóa điều trị bổ sung, ví dụ, các chất bất kỳ được liệt kê ở trên hoặc dẫn xuất của chúng, có thể được dùng trước, đồng thời hoặc ngay sau khi dùng kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế; (đối với mục đích của công bố này, phác đồ sử dụng thuốc như trên được coi là việc cung cấp kháng thể kháng EGFRvIII “kết hợp với” một thành phần hoạt hóa điều trị bổ sung). Sáng chế bao gồm các được phẩm, trong đó một kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế đồng cung cấp với một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa điều trị bổ sung như được mô tả ở những chỗ khác trong tài liệu này.

Phác đồ dùng thuốc

Theo như các phương án nhất định của sáng chế, nhiều liều dùng kháng thể kháng EGFRvIII (hoặc được phẩm có chứa kháng thể kháng EGFRvIII kết hợp với một chất điều trị bổ sung bất kỳ được đề cập ở đây) có thể được cung cấp cho bệnh nhân trong một thời gian nhất định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc cung cấp tuần tự cho bệnh nhân nhiều liều kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, “cung cấp tuần tự” có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng EGFRvIII được cung cấp cho bệnh nhân tại các thời điểm khác nhau, ví dụ, được phẩm được cung cấp vào các ngày khác nhau cách nhau một khoảng thời gian định trước (ví dụ, giờ, ngày, tuần, tháng). Sáng chế đề cập đến các phương pháp bao gồm việc cung cấp tuần tự cho bệnh nhân một liều kháng thể kháng EGFRvIII thứ nhất, sau đó cung cấp một hoặc nhiều liều kháng thể kháng EGFRvIII thứ hai, và sau

đó cung cấp tùy ý một hoặc nhiều liều kháng thể kháng EGFRvIII thứ ba.

Các thuật ngữ ‘liều thứ nhất’, ‘liều thứ hai’, và “liều thứ ba”, dùng để chỉ trình tự thời gian cung cấp kháng thể kháng EGFRvIII của sáng chế. Do đó, “liều thứ nhất” là liều được cung cấp tại thời điểm bắt đầu phác đồ điều trị (cũng được đề cập như ‘liều cơ sở’); “liều thứ hai” là liều được cung cấp sau liều thứ nhất; và “liều thứ ba” là liều được cung cấp sau liều thứ hai. Liều thứ nhất, thứ hai và thứ ba có thể chứa cùng một lượng kháng thể kháng EGFRvIII, nhưng nhìn chung có thể khác nhau về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, lượng kháng thể kháng EGFRvIII trong liều thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba là khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh lên hoặc xuống sao cho phù hợp) trong suốt quá trình điều trị. Theo các phương án nhất định, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được cung cấp tại thời điểm bắt đầu của phác đồ điều trị, được gọi là “liều nạp” sau đó là các liều tiếp theo được cung cấp trên cơ sở ít thường xuyên hơn (ví dụ, “liều duy trì”).

Theo các phương án lấy làm ví dụ nhất định của sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc thứ ba được cung cấp từ 1 đến 26 (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc nhiều hơn) tuần ngay sau liều trước đó. Cụm từ “liều ngay trước đó”, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là, trong trình tự nhiều liều được cung cấp, liều kháng thể kháng EGFRvIII được cung cấp cho bệnh nhân trước khi cung cấp liều rất gần tiếp theo mà không cung cấp liều khác xen vào giữa.

Các liệu pháp điều trị theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm việc cung cấp cho bệnh nhân số lượng liều thứ hai và/hoặc thứ ba bất kỳ của kháng thể kháng EGFRvIII. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chỉ có duy nhất một liều thứ hai được cung cấp cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ hai được cung cấp cho bệnh nhân. Ngoài ra, theo các phương án nhất định, chỉ có duy nhất một liều thứ ba được cung cấp cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ ba được cung cấp cho bệnh nhân. Phác đồ cung cấp thuốc có thể được cung cấp mãi mãi cho đối tượng cụ thể, hoặc cho đến khi việc điều trị như trên không còn cần thiết hoặc không thuận lợi nữa.

Trong phương án có nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được cung cấp

với một tần suất giống các liều thứ hai khác. Ví dụ, mỗi liều thứ hai có thể được cung cấp cho bệnh nhân từ 1 tuần đến 2 tuần hoặc 1 tháng đến 2 tháng sau liều ngay trước đó. Tương tự, trong phương án có nhiều liều thứ ba, mỗi liều thứ ba có thể được cung cấp với một tần suất giống các liều thứ ba khác. Ví dụ, mỗi liều thứ ba có thể được cung cấp cho bệnh nhân từ 2 tuần đến 12 tuần sau liều ngay trước đó. Theo các phương án nhất định của sáng chế, tần suất cung cấp liều thứ hai và/hoặc thứ ba cho bệnh nhân có thể khác nhau trong suốt quá trình điều trị. Tần suất cung cấp cũng có thể được bác sĩ điều chỉnh trong quá trình điều trị phụ thuộc vào nhu cầu của từng bệnh nhân sau khi khám lâm sàng.

Sáng chế bao gồm các phác đồ cung cấp thuốc, trong đó, 2 đến 6 liều nạp được cung cấp cho bệnh nhân theo tần suất thứ nhất (ví dụ, một tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, một tháng một lần, hai tháng một lần, v.v.), sau đó cung cấp hai hoặc nhiều liều duy trì cho bệnh nhân trên với tần suất ít thường xuyên hơn. Ví dụ, theo như khía cạnh này của sáng chế, nếu liều nạp được cung cấp với tần suất một tháng một lần thì liều duy trì có thể được cung cấp cho bệnh nhân sáu tuần một lần, hai tháng một lần, ba tháng một lần, v.v..

Tác dụng chẩn đoán của kháng thể

Các kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế có thể cũng được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo EGFRvIII, hoặc các tế bào biểu hiện EGFRvIII trong mẫu, ví dụ, sử dụng cho mục đích chẩn đoán. Ví dụ, một kháng thể kháng EGFRvIII, hoặc một đoạn của nó, được sử dụng để chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng bệnh được đặc trưng bởi các biểu hiện khác thường (ví dụ, việc biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, thiếu biểu hiện, v.v.) của EGFRvIII. Các xét nghiệm chẩn đoán EGFRvIII có thể bao gồm, ví dụ, tiếp xúc với mẫu, thu mẫu từ bệnh nhân, với một kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế, trong đó, kháng thể kháng EGFRvIII được gắn nhãn với một nhãn phát hiện hoặc phân tử báo cáo. Ngoài ra, một kháng thể kháng EGFRvIII không được gắn nhãn có thể được sử dụng trong các ứng dụng chuẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ cấp mà chính nó đã tự có nhãn phát hiện. Nhãn phát hiện hoặc phân tử báo cáo có thể là một đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; một nửa huỳnh quang hoặc huỳnh quang hóa học như huỳnh quang isothiocyanat, hoặc rhodamin; hoặc một enzym như alkaline phosphatase, beta-galactosidase, peroxidase củ cải ngựa, hoặc luciferase. Các xét nghiệm dùng để phát hiện hoặc đo lượng EGFRvIII trong một mẫu

bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA), xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và phân loại tế bào tế bào thông qua huỳnh quang (FACS).

Các mẫu có thể dùng trong xét nghiệm chuẩn đoán EGFRvIII theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch bất kỳ thu được từ cơ thể bệnh nhân có số lượng protein EGFRvIII hoặc các đoạn của nó đạt tới mức có thể phát hiện được, trong tình trạng bình thường hoặc trong tình trạng bệnh lý. Nhìn chung, mức EGFRvIII trong một mẫu cụ thể thu được từ bệnh nhân khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến hoạt động hoặc nồng độ EGFRvIII bất thường) bước đầu sẽ được đo để thiết lập một đường cơ sở, hoặc đường tiêu chuẩn, đường nồng độ EGFRvIII. Đường nồng độ EGFRvIII cơ sở sau đó được so sánh với nồng độ EGFRvIII đo được trong các mẫu thu được từ các đối tượng nghi ngờ mắc bệnh hoặc triệu chứng có liên quan đến EGFRvIII.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra nhằm mục đích cung cấp cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật những mô tả chi tiết về cách thức tiến hành và sử dụng các phương pháp và thành phần theo sáng chế, và không dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các tác giả đã rất cố liên kếtg để đảm bảo tính chính xác đối với các số liệu sử dụng, tuy nhiên cần lưu ý một số lỗi thực nghiệm và sai số. Trừ khi chỉ ra khác, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là nhiệt độ ở độ C, và áp suất là áp suất khí quyển hoặc áp suất cận khí quyển.

Ví dụ 1. Tạo ra kháng thể kháng EGFRvIII

Kháng thể kháng EGFRvIII thu được bằng cách gây miễn dịch ở chuột VELOCIMMUNE® (tức là, chuột được chuyển gen chứa ADN mã hóa cho vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa người) với chất kháng nguyên chứa vùng ngoại bào của EGFRvIII. Kháng thể trong tập hợp thứ nhất bao gồm các kháng thể đã được thiết kế di truyền như H1H2194P, H1H2195P, H2M1863N2, H2M1911N, H2M1912N, H2M1915N, H2M1917N, H2M1918N, và H3M1913N (được trình bày ở Bảng 1 và Bảng 2).

Đáp ứng miễn dịch kháng thể được quan sát bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu EGFRvIII. Thu được đáp ứng miễn dịch mong muốn khi tế bào đơn nhân lách được thu hoạch và dung hợp với tế bào u tủy của chuột để bảo tồn khả năng phát triển

và tồn tại độc lập cũng như hình dạng của dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai được sàng lọc và lựa chọn để nhận diện các dòng tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu EGFRvIII. Sử dụng kỹ thuật này giúp thu được một số kháng thể kháng EGFRvIII thể khảm (tức là, các kháng thể chứa vùng biến đổi người và vùng hằng định chuột). Hơn nữa, một số kháng thể kháng EGFRvIII có chiều dài đầy đủ của người được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính kháng nguyên mà không dung hợp với tế bào u tủy, như được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ US 2007/0280945A1.

Ngoài ra, H1H1863N2 giảm fucosyl hóa [“H1H1863N2(Fuc-)”] cũng được tạo ra trong dòng tế bào chủ CHO, là dòng tế bào được mô tả là “8088” trong đơn sáng chế Mỹ số 2010/0304436A1. Tóm lại, trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của H1H1863N2 được tách dòng vào trong các vector biểu hiện. Hai triệu tế bào 8088 được chuyển nhiễm với plasmit chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, và vector pR4004 chứa gen mã hóa Cre. Các tế bào đã chuyển nhiễm sống sót sau khi chọn lọc với 400 µg/ml hygromycin được thích nghi để phát triển trong môi trường huyền phù không huyết thanh, không fucose. Các tế bào biểu hiện protein huỳnh quang EGFP nhưng không phải là DsRed hoặc ECFP từ các tế bào chuyển nhiễm được phân lập bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Các tế bào sau khi phân loại được cấy vào trong bình lắc với nồng độ 4×10^5 tế bào/ml và, ba ngày sau, thu môi trường nuôi cấy và protein kháng thể trong đó [tức là, H1H1863N2(Fuc-)] được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký Protein A. Phân tích khối phổ kết quả H1H1863N2(Fuc-) xác nhận rằng lõi fucose đã được loại bỏ so với H1H1863N2(Fuc+), kháng thể ban đầu. Cả hai kí hiệu “H1H1863N2” và “H1H1863N2(Fuc+)” ở đây đều dùng để chỉ kháng thể ban đầu mà không có biến đổi fucosyl hóa.

Các đặc tính sinh học nhất định của kháng thể kháng EGFRvIII được tạo ra phù hợp với các phương pháp của ví dụ này được mô tả chi tiết trong các ví dụ được trình bày dưới đây.

Ví dụ 2. Trình tự axit amin và axit nucleic vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 1 trình bày trình tự nhận biết trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và vùng CDR của kháng thể kháng EGFRvIII được lựa chọn theo sáng chế. Các trình tự nhận biết axit nucleic tương ứng được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 1: Trình tự nhận biết trình tự axit amin

	SEQ ID No:							
Kí hiệu kháng thể	HC VR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H2194P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H2195P	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M1863N2	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M1911N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M1912N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M1915N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M1917N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M1918N	114	116	118	120	122	124	126	128
H3M1913N	130	132	134	136	138	140	142	144

Bảng 2: Trình tự nhận biết trình tự axit nucleic

	SEQ ID No:							
Kí hiệu kháng thể	HC VR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H2194P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H2195P	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M1863N2	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M1911N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M1912N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M1915N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M1917N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M1918N	113	115	117	119	121	123	125	127
H3M1913N	129	131	133	135	137	139	141	143

Các kháng thể thường được đề cập đến ở đây theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ, "H1H", "H2M", "H3M", v.v.), theo sau là trình tự nhận biết dạng số (ví dụ, "2194", "2195", "1863", v.v.), sau đó là hậu tố "P" hoặc "N", như được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2. Do đó, theo danh pháp này, kháng thể có thể được đề cập đến ở đây như, ví dụ, "H1H2194N", "H2M1911N", "H3M1913N", v.v.. Các tiền tố H1H, H2M và H3M trong kí hiệu kháng thể được sử dụng ở đây để chỉ isotyp vùng Fc cụ thể của kháng thể. Ví dụ, kháng thể "H1H" có một Fc IgG1 người, kháng thể "H2M" có một Fc IgG2 chuột, và kháng thể "H3M" có một Fc IgG3 chuột, (tất cả các vùng biến đổi có nguồn gốc hoàn toàn từ người đều được ký hiệu bằng chữ "H" đầu tiên trong kí

hiệu kháng thể). Như những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhìn nhận, kháng thể có isotyp Fc cụ thể có thể được biến đổi thành kháng thể có isotyp Fc khác nhau (ví dụ, kháng thể với Fc IgG1 chuột có thể được biến đổi thành kháng thể với IgG4 người, v.v.) tuy nhiên, trong mọi trường hợp, vùng biến đổi (bao gồm các vùng CDR), là vùng được kí hiệu bằng các trình tự nhận biết trong Bảng 1 và Bảng 2, vẫn sẽ được giữ nguyên, và các đặc tính liên kết được mong đợi là sẽ tương đồng hoặc gần giống mà không phụ thuộc vào tính chất của vùng Fc.

Các mẫu đối chứng được sử dụng trong các ví dụ

Các mẫu đối chứng được sử dụng trong các thử nghiệm dưới đây nhằm mục đích so sánh: Đối chứng I: kháng thể kháng EGFRvIII người (IgG1) chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin lần lượt tương đồng với SEQ ID No: : 142 và 144, của kháng thể “13.1.2” được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 7,736,644; Đối chứng II: kháng thể kháng EGFRvIII thể khảm (hIgG1) chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin lần lượt tương đồng với SEQ ID No: :11 và 12, của kháng thể “ch806” được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 7,589,180; Đối chứng III: kháng thể kháng EGFRvIII được nhân hóa (hIgG1) chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin lần lượt tương đồng với SEQ ID No: :42 và 47, của kháng thể “hu806” được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 2010/00567627; Đối chứng IV: kháng thể kháng EGFR thể khảm chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng với các vùng “C225”, như được trình bày trong bằng sáng chế Mỹ US 7,060,808; và Đối chứng V: kháng thể kháng EGFRvIII người (IgG1) chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin lần lượt tương đồng với SEQ ID No: :2 và 19, của kháng thể “131” trong sáng chế Mỹ số 7,736,644 B2. Kháng thể “13.1.2” được biết đến là đặc hiệu với peptit nối (SEQ ID No: 148) của EGFRvIII; và kháng thể “ch806” và “hu806” được biết đến là có khả năng liên kết với các gốc 311-326 (SEQ ID No: 165) của EGFR (SEQ ID No: 146), là các gốc được khuếch đại hoặc biểu hiện quá mức, hoặc là các gốc 44-59 của EGFRvIII (SEQ ID No: 147).

Ví dụ 3. Xác định ái lực liên kết EGFRvIII

Ái lực liên kết và hằng số động học của kháng thể đơn dòng kháng EGFRvIII người được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt tại 37°C. Việc đo ái lực được tiến hành trên máy T100 BIACORE™. Các kháng thể biểu hiện như Fc IgG1 người (tức là, ký hiệu là “H1H”), được bắt giữ lên bề mặt cảm biến kháng Fc

người (định dạng bắt giữ mAb), và các protein monome hòa tan [EGFR-mmh (SEQ ID No: 154) và EGFRvIII-mmh (SEQ ID No: 152)] hoặc dime [EGFR-mFc (SEQ ID No: 155) và EGFRvIII-mFc (SEQ ID No: 153)] được phun lên bề mặt. Theo định dạng bắt giữ-thụ thể, hoặc EGFRvIII-mFc hoặc EGFR-mFc đều bị bắt giữ lên trên chip BIACORE™ và các kháng thể tương ứng chảy qua. Hằng số tỷ lệ giữa động học liên kết (k_a) và động học phân ly (k_d) được xác định bằng cách xử lý và điều chỉnh dữ liệu theo mô hình liên kết 1:1 sử dụng phần mềm khớp đường cong Scrubber 2.0. Hằng số cân bằng phân ly phân ly (K_D) và thời gian phân ly một nửa được tính toán từ hằng số tỷ lệ động học theo công thức: $K_D (M) = k_d/k_a$; và $t_{1/2} (\text{phút}) = \ln 2 / (60 * k_d)$.

Kết quả được trình bày trong Bảng 3 và 4. NB= không liên kết dưới điều kiện thử nghiệm; NT= không được thử nghiệm.

Bảng 3 (Động học liên kết của kháng thể Fc người)

Liên kết ở 37°C/ Định dạng bắt MAb					
Kháng thể	Chất phân tích	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (M)$	$T_{1/2}$
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mmh	1,97E+04	8,95E-03	4,54E-07	1,3
	EGFR-mmh	NT	NT	NT	NT
	EGFRvIII-mFc	7,28E+04	8,07E-04	1,11E-08	14
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mmh	3,02E+04	1,02E-02	3,39E-07	1,1
	EGFR-mmh	KG	KG	KG	KG
	EGFRvIII-mFc	1,12E+05	6,42E-04	5,73E-09	18
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1911N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1912N	EGFRvIII-mmh	1,83E+04	1,64E-02	8,99E-07	0,7
	EGFR-mmh	KG	KG	KG	KG
	EGFRvIII-mFc	2,04E+04	9,71E-04	4,77E-08	12
	EGFR-mFc	KG	KG	KG	KG
H1H1913N	EGFRvIII-mmh	1,63E+02	1,14E-03	7,03E-06	10
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1,40E+04	3,16E-04	2,26E-08	37
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1915N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H2194P	EGFRvIII-mmh	8,10E+04	1,37E-03	1,70E-08	8

	EGFR-mmh	7,60E+04	9,60E-04	1,26E-08	12
	EGFRvIII-mFc	9,54E+04	2,22E-04	2,33E-09	52
	EGFR-mFc	8,10E+04	1,99E-04	2,43E-09	58
H1H2195P	EGFRvIII-mmh	6,48E+04	6,94E-04	1,07E-08	17
	EGFR-mmh	5,66E+04	5,23E-04	9,20E-09	22
	EGFRvIII-mFc	1,02E+05	1,13E-04	1,10E-09	103
	EGFR-mFc	9,20E+04	1,89E-04	2,05E-09	61
Đối chứng I	EGFRvIII-mmh	1,29E+05	1,53E-01	1,19E-06	0,1
	EGFR-mmh	KG	KG	KG	KG
	EGFRvIII-mFc	7,15E+04	7,36E-03	1,03E-07	1,6
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
Đối chứng II	EGFRvIII-mmh	4,90E+04	7,33E-03	1,50E-07	2
	EGFR-mmh	KG	KG	KG	KG
	EGFRvIII-mFc	2,02E+05	4,08E-04	2,02E-09	28
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
Đối chứng III	EGFRvIII-mmh	8,57E+04	5,16E-03	6,02E-08	2,2
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2,52E+05	2,98E-04	1,18E-09	39
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
Đối chứng V	EGFRvIII-mmh	1,94E+05	1,59E-02	8,20E-08	1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1,91E+05	3,71E-04	1,95E-09	31
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT

Bảng 4 (Động học liên kết của kháng thể Fc người)

Liên kết ở 37°C/ Định dạng bất giữ thụ thể					
Kháng thể	Thụ thể bị bất giữ	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	$T_{1/2}$
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mFc	9,00E+05	2,06E-04	2,30E-10	56
	EGFR-mFc	2,11E+05	1,82E-01	8,65E-07	0,1
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mFc	1,01E+06	2,15E-04	2,10E-10	54
	EGFR-mFc	1,99E+05	4,67E-01	2,34E-06	0,02
H1H1911N	EGFRvIII-mFc	3,29E+04	6,43E-04	1,95E-08	18
	EGFR-mFc	7,77E+03	1,74E-03	2,24E-07	7
H1H1912N	EGFRvIII-mFc	9,90E+04	5,37E-04	5,40E-09	22
	EGFR-mFc	3,99E+04	9,14E-04	2,29E-08	13
H1H1913N	EGFRvIII-mFc	6,30E+04	1,00E-06	1,58E-11	11550
	EGFR-mFc	5,93E+03	1,00E-06	1,69E-10	11550
H1H1915N	EGFRvIII-mFc	1,00E+05	3,28E-04	3,20E-09	35
	EGFR-mFc	4,35E+04	8,01E-03	1,84E-07	1,4
H1H2193N	EGFRvIII-mFc	2,17E+05	5,85E-05	2,68E-10	197
	EGFR-mFc	2,04E+05	9,15E-05	4,47E-10	126
H1H2194N	EGFRvIII-mFc	1,88E+05	7,38E-05	3,94E-10	157
	EGFR-mFc	1,87E+05	7,07E-05	3,80E-10	163
H1H2195N	EGFRvIII-mFc	2,37E+05	2,53E-05	1,06E-10	456

	EGFR-mFc	2,25E+05	5,20E-05	2,31E-10	222
Đối chứng I	EGFRvIII-mFc	4,46E+05	4,04E-03	9,06E-09	2,9
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
Đối chứng II	EGFRvIII-mFc	1,25E+06	7,31E-05	5,90E-11	158
	EGFR-mFc	4,44E+05	1,46E-04	3,29E-10	79
Đối chứng III	EGFRvIII-mFc	1,49E+06	1,00E-06	6,70E-13	11550
	EGFR-mFc	2,86E+05	6,17E-05	2,15E-10	187

Như được trình bày ở Bảng 3 và bảng 4, một số kháng thể thể hiện tính chọn lọc đối với EGFRvIII và không liên kết với EGFR kiểu đại trong định dạng bắt giữ mAb. Trong định dạng bắt giữ-thụ thể (Bảng 4) H1H863N2, H1H1915N và đối chứng I thể hiện tính chọn lọc lớn nhất.

Thử nghiệm 4: Xác định tính đặc hiệu kháng thể bằng phương pháp ELISA

Để mô tả thêm về các mAb kháng hEGFRvIII, tính đặc hiệu liên kết của chúng được kiểm tra bằng phương pháp ELISA. Các đĩa được phủ với một trong các chất sau: EGFR-mmh (SEQ ID No: 154); EGFRvIII-mmh (SEQ ID No: 152); và một peptit nối (peptit J) (SEQ ID No: 148). Đối với các peptit nối được liên kết với biotin ở đầu C (SEQ ID No: 149) hoặc đầu N (SEQ ID No: 150) qua một cầu nối, các đĩa này sẽ được phủ trước với avidin. Ngoài ra, lớp phủ là một peptit không liên quan (peptit đối chứng) có hoặc không có biotin ở đầu N của nó. Kháng thể kháng EGFRvIII cũng như kháng thể đối chứng isotyp được thêm vào đĩa đã phủ và cho ủ trong 1 giờ tại nhiệt độ 25°C. Các đĩa sau đó được rửa sạch và mAb kháng EGFRvIII đã liên kết được phát hiện với kháng thể kháng Fc người tiếp hợp với peroxidaza củ cải ngựa (HRP). Bổ sung thêm dung dịch cơ chất tetra-metyl-benzidin (TMB) vào các đĩa để tạo ra phản ứng tạo màu và trung hòa với axit sulfuric trước khi đọc độ hấp thụ ở 450 nm bằng máy đọc đĩa VICTOR™ X5. Sử dụng mô hình liều lượng-đáp ứng xichma trong phần mềm PRISM™ để phân tích dữ liệu. Giá trị EC₅₀, được định nghĩa là 50% nồng độ kháng thể cần để phát triển đáp ứng tối đa, được sử dụng như một chỉ số về khả năng liên kết. Các kết quả thu được được trình bày trong Bảng 5. NT: Không thử nghiệm. Đối chứng I-III: Như được mô tả ở trên.

Bảng 5

Kháng thể	EC ₅₀ (nM)						
	EGFR-mmh (25°C)	EGFRvIII-mmh (25°C)	Peptit J	Peptit J gắn biotin đầu C	Peptit J gắn biotin đầu N	Peptit đối chứng	Peptit đối chứng gắn

							biotin đầu N
H1H1863N 2 (Fuc-)	>10	0,0766	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1863N 2 (Fuc+)	>10	0,113	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1911N	9,06	0,0748	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1912N	0,0405	0,0118	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1913N	2,55	2,14	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1915N	>10	0,167	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2193P	0,0040	0,0035	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2194P	0,0037	0,0032	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2195P	0,0052	0,0049	>10	>10	>10	>10	>10
Đối chứng I	>10	0,0094	0,118	0,0153	0,0106	>10	>10
Đối chứng II	0,0095	0,0057	>10	>10	>10	>10	>10
Đối chứng III	0,0079	0,0048	NT	NT	NT	NT	NT
Đối chứng isotyp	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

Các kháng thể H1H1863N2, H1H1915 và đối chứng I có khả năng liên kết mạnh với EGFRvIII nhưng không liên kết (>10 nM) với EGFR kiểu đại. Không một kháng thể nào, trừ đối chứng I (có trình tự tương đồng với trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể “13.1.2” có nguồn gốc từ chuột bị gây miễn dịch với peptit nổi (bằng sáng chế Mỹ số 7,736,644)) thể hiện liên kết với các peptit nổi.

Ví dụ 5: Western Blot EGFR và EGFRvIII sử dụng kháng thể kháng EGFRvIII

H1H1863N2 là một trong các kháng thể được kiểm tra các đặc tính liên kết của nó bằng phương pháp western blot trong cả điều kiện khử và không khử. EGFR-mmh (SEQ ID No: 154) hoặc EGFRvIII-mmh (SEQ ID No: 152) được đưa vào gel Tris-Glycin SDS PAGE, chạy điện di và sau đó được chuyển vào màng nitroxenluloza. Sau khi xử lý màng lai để ngăn chặn liên kết giữa màng và kháng thể, màng được cắt một nửa và được dò với kháng thể kháng EGFRvIII hoặc kháng thể kháng His. Đối chứng I và II được mô tả ở trên.

Như được thể hiện trong Fig.1a, H1H1862N2 (Fuc-) không liên kết với EGFRvIII-mmh hoặc EGFR-mmh được khử hoặc không được khử và do đó có epitop cấu dạng với EGFRvIII. Ngược lại, đối chứng II liên kết với cả EGFR kiểu đại và EGFR biến thể nhóm III dưới điều kiện khử và không khử, trong khi đối chứng I, là

chất gắn peptit nổi, liên kết đặc hiệu với EGFRvIII. Trái ngược với H1H1863N2, cả hai đối chứng I và II đều có các epitop liên kết thẳng. Fig.1b cho thấy các kháng thể EGFRvIII khác, thể hiện các hành vi hỗn hợp trên Western blot.

Ví dụ 6: Thử nghiệm gắn peptit EGFR/EGFRvIII và cạnh tranh kháng thể

H1H1863N2(Fuc-) được thử nghiệm các đặc tính liên kết của nó bằng thử nghiệm gắn peptit và cạnh tranh kháng thể. Đối với các thử nghiệm gắn peptit, peptit nổi EGFRvIII (SEQ ID No: 148) được liên kết thông qua một cầu nối với biotin tại đầu C của nó [tức là, LEEKKGNYVVTDHGGGGSK (SEQ ID No: 149)-biotin] hoặc peptit có chứa các gốc 311-326 của EGFR (“peptit EGFR 311-326”, SEQ ID No: 165) được liên kết thông qua cầu nối với biotin ở đầu C của nó [tức là, CGADSYEMEEDGVRKCGGGGSK (SEQ ID No: 151)-biotin] được bắt giữ lên màng độ dày xấp xỉ 0,4 nM bằng các đầu hút OCTET® phủ streptavidin trên thiết bị FORTEBIO® OCTET® RED. Sau khi bắt giữ peptit, các đầu hút đã phủ được đưa vào trong 1 μ M dung dịch kháng thể và phản ứng liên kết được ghi lại (tham khảo Fig.2). Các đối chứng I-III đều giống những mô tả ở trên.

Đúng như dự đoán, đối chứng I liên kết với peptit nổi có biotin đầu C và đối chứng II và III liên kết với peptit 311-326 EGFR có biotin đầu C. H1H1863N2(Fuc-) không liên kết với peptit nào.

Đối với thử nghiệm cạnh tranh chéo kháng thể, xấp xỉ 200 đơn vị cộng hưởng (RU) của hEGFRvIII-mmh (SEQ ID No: 152) được bắt giữ lên trên bề mặt BIACORE™ phủ một lớp kháng thể đa dòng kháng penta-Histidin (cat. # 34660, QUIAGEN) mật độ cao. Sử dụng phương pháp tiêm cùng lúc, hEGFRvIII-mmh bị bắt giữ được bão hòa bằng cách tiêm 500nM mAb thứ nhất để trong 5 phút, ngay lập tức sau đó tiêm mAb thứ hai (500nM) khác để trong 5 phút. Liên kết đáng kể, biểu hiện dưới dạng RU, của mAb thứ hai được giải thích là do nó không cạnh tranh để liên kết với mAb thứ nhất. Trong các isotyp thử nghiệm đối chứng tương ứng với mAb được sử dụng hoặc làm mAb thứ nhất hoặc làm mAb thứ hai. Các kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6

Bề mặt BIACORE™ (Kháng thể thứ nhất)	Liên kết kháng thể thứ hai (RU)			
	Đáp ứng liên kết H1H1863N2(Fuc-)	Đáp ứng liên kết đối chứng I	Đáp ứng liên kết đối chứng II	Đáp ứng liên kết đối chứng III

Một mình EGFRvIII	270	234	247	247
Phức hợp EGFRvIII - H1H1863N2(Fuc-)	5	253	191	208
Phức hợp EGFRvIII-đối chứng I	291	5	258	272
Phức hợp EGFRvIII-đối chứng II	225	252	6	25
Phức hợp EGFRvIII-đối chứng III	223	254	13	7

H1H1863N2(Fuc-) không cạnh tranh với bất kỳ kháng thể đối chứng I-III nào để liên kết với bề mặt bắt giữ hEGFRvIII. Như mong đợi, cả hai đối chứng II và III, đều được biết đến là có khả năng liên kết với các gốc 311-326 của EGFR, cạnh tranh nhau để liên kết với bề mặt bắt giữ EGFRvIII-mmh.

Ví dụ 7: Tính chọn lọc tế bào liên kết của kháng thể kháng EGFRvIII

Để xác định tính đặc hiệu của mAb kháng EGFRvIII, khả năng liên kết của chúng với các tế bào HEK293, HEK293 biểu hiện EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII) và tế bào A431, được phân tích bằng phương pháp phân loại tế bào thông qua phát xạ huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting-FACS). Các tế bào HEK293/EGFRvIII được tạo ra bằng cách chuyển các vector ADN kháng neomycin chủ yếu biểu hiện hEGFRvIII có chiều dài đầy đủ (SEQ ID No: 147) vào tế bào HEK239 sử dụng chất chuyển nhiễm LIPOFECTAMIN™ 2000 (INVITROGEN™). Hai ngày sau khi chuyển nhiễm, tế bào được đặt trong môi trường chọn lọc G418 trong khoảng hai tuần. Quần thể biểu hiện dương tính với EGFRvIII được phân lập bằng phương pháp phân loại tế bào thông qua phát xạ huỳnh quang (FACS). Các tế bào HEK293 biểu hiện xấp xỉ 3×10^6 bản sao của EGFRvIII trên mỗi tế bào được sử dụng trong thử nghiệm. Tóm lại, kháng thể kháng EGFRvIII ở mức 10 µg/ml được ủ với các tế bào trong khoảng 30 phút tại nhiệt độ phòng, được rửa, sau đó ủ tiếp với kháng thể thứ hai, tức là, F(ab')₂ dê gắn nhãn phycoerythrin (PE) kháng IgG người (cat # 109-116-170, Jackson ImmunoResearch Laboratories), sau đó được rửa lần cuối trước khi phân tích FACS. Theo các thử nghiệm khác, kháng thể kháng EGFRvIII được liên hợp trực tiếp qua gốc lysin của chúng với thuốc nhuộm huỳnh quang, ALEXA FLUOR® 488 Dye (INVITROGEN™), nhờ đó loại bỏ được bước sử dụng kháng thể thứ hai. Các tế bào HEK239 và HEK239/EGFRvIII thu được được sử dụng trực tiếp để gắn

nhãn kháng thể kháng EGFRvIII được trình bày trong Bảng 7 và các kết quả sử dụng kháng thể kháng Fc (người hoặc chuột) gắn nhãn PE thứ hai được trình bày trong Bảng 8. Các kết quả thu được từ tế bào A431 sử dụng kháng thể kháng EGFRvIII gắn nhãn trực tiếp được trình bày trong Bảng 9 và các kết quả thu được sử dụng kháng thể kháng Fc (người hoặc chuột) gắn nhãn PE thứ hai được trình bày trong Bảng 10. Đối chứng I, II, III, IV và V được mô tả ở trên. MFI: Cường độ huỳnh quang trung bình.

Bảng 7

Kháng thể	MFI HEK293 mẹ	MFI HEK 293/EGFRvIII	Tỉ lệ (MFI EGFRvIII/MFI mẹ)
Không được nhuộm	3548	4005	1,1
H1H1863N2 (Fuc-)	3776	361000	95,6
H1H1863N2 (Fuc-)	3805	360000	94,6
H1H1911N	3593	55064	15,3
H1H1912N	3727	122000	32,7
H1H1913N	4801	239000	49,8
H1H1915N	3461	73413	21,2
Đối chứng I	3559	258000	72,5
Đối chứng II	3582	313000	87,4
Đối chứng IV	24954	439000	17,6

Bảng 8

Kháng thể	MFI HEK293 mẹ	MFI HEK 293/EGFRvIII	Tỉ lệ (MFI EGFRvIII /MFI mẹ)
Không được nhuộm	819	920	1,1
Kháng IgG người kháng PE	1027	1106	1,1
H1H1863N2 (Fuc-)	1671	301000	180,1
H1H1911N	1812	107000	59,1
H1H2194P	981	18583	18,9
H1H2195P	1176	13517	11,5
Đối chứng I	1480	272000	183,8
Đối chứng II	1015	313000	308,4
Đối chứng IV	23325	354000	15,2
Đối chứng V	11732	997062	85,0

Bảng 9

Kháng thể	A431 MFI	Lần trên nền
Không được nhuộm	6708	1,0
H1H1863N2 (Fuc-)	26036	3,9
H1H1911N	15984	2,4

H1H1912N	14343	2,1
H1H1915N	8440	1,2
Đối chứng I	9652	1,4
Đối chứng II	15716	2,3
Đối chứng III	71514	10,7
Đối chứng IV	962000	143,4

Bảng 10

Kháng thể	A431 MFI	Lần trên nền
Không được nhuộm	1314	0,9
Kháng IgG người kháng PE	1428	1,0
H1H1863N2 (Fuc-)	3385	2,4
H1H1911N	3140	2,2
H1H2194P	2291	1,6
H1H2195P	2227	1,6
Đối chứng I	1448	1,0
Đối chứng II	5576	3,9
Đối chứng IV	395000	276,6
Đối chứng V	4240	3,0

Một số kháng thể kháng EGFRvIII có sự ưu tiên liên kết rõ ràng đối với dòng tế bào HEK293/EGFRVIII so với tế bào HEK293 bố mẹ khi chúng được phát hiện bằng cách sử dụng trực tiếp kháng thể kháng EGFRvIII được gắn nhãn (Bảng 7) hoặc kháng thể kháng IgG người gắn nhãn PE thứ hai (Bảng 8). Hầu hết kháng thể khi được ủ với tế bào A431 (trong 30 phút tại nhiệt độ 4°C) thể hiện khả năng liên kết kết tối thiểu hoặc không liên kết, ngoại trừ kháng thể đối chứng III và IV (Bảng 9 và 10).

Ví dụ 8: Sự nội bào hóa của mAb kháng EGFRvIII bởi tế bào HEK293/EGFRVIII

Các mAb kháng EGFRvIII (tại nồng độ 10ug/ml) được ủ với tế bào HEK293/EGFRVIII (tham khảo, ví dụ 7) trong 2 giờ trên đá, sau đó rửa hai lần với PBS. Sau đó, các tế bào được ủ 30 phút trên đá với các mảnh Fab kháng IgG người liên hợp với 488 DYLIGHT™ thứ hai (Jackson ImmunoResearch Laboratories), rồi rửa hai lần bằng PBS bổ sung. Kháng thể được nội bào hóa trong 1 giờ tại nhiệt độ 37°C trong đệm nội bào hóa (PBS + FBS) hoặc giữ ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được cố định trong formandehit 4%, và được nhuộm nhân với thuốc nhuộm ADN DRAQ5® (Cell Signaling Technology, Inc.). Các hình ảnh ở độ phóng đại 40x trên hệ thống hàm

lượng cao IMAGEEXPRESS™ (các thiết bị phân tử) và các hạt nội bào hóa được định lượng bằng phần mềm Columbus (Perkin Elmer). Các kết quả thu được được trình bày trong Bảng 11 và Fig.3.

Bảng 11

Kháng thể	Cường độ huỳnh quang của các hạt ở 4°C		Cường độ huỳnh quang của các hạt ở 37°C	
	Giá trị trung bình	± SD	Giá trị trung bình	± SD
H1H1863N2(Fuc-)	29896	8333	617184	46823
H1H1911N	29834	11879	280439	61121
H1H1912N	4912	1774	370201	12205
Đối chứng I	21981	4613	263506	28067
Đối chứng II	20339	5644	615239	144397
Đối chứng IV	92311	19386	1078196	106073

Nội bào hóa mạnh xảy ra tại nhiệt độ 37°C đối với H1H1863N2, đối chứng II, và đối chứng IV. Nội bào hóa cũng được quan sát thấy ở H1H1911N, H1H1912N và đối chứng I.

Ví dụ 9: Khả năng liên kết của kháng thể kháng EGFRvIII với khối u ghép ngoại lai U87/EGFRvIII

Để xác định thêm về tính đặc hiệu của H1H1863N2, dòng tế bào u nguyên bào đệm người U87 biểu hiện EGFRvIII được tạo ra như được mô tả cho tế bào HEK293/EGFRvIII trong ví dụ 7. Các tế bào U87 biểu hiện xấp xỉ $1,5 \times 10^5$ bản sao của EGFRvIII trên mỗi tế bào (U87/EGFRvIII) được sử dụng trong thử nghiệm. Tế bào U87/EGFRvIII (3×10^6 tế bào) được ghép ngoại lai vào chuột suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (severe combined immunodeficient-SCID) và các khối u được cho phát triển đến khi đạt kích thước trung bình 200-300 mm³. Sau đó chuột được tiêm H1H1863N2(Fuc-) hoặc đối chứng isotyp qua tĩnh mạch đuôi. Sau khi tiêm kháng thể 10 phút, 4 giờ, và 24 giờ, giết chết chuột và lấy khối u ra và đặt vào trong PBS. Các khối u ngay lập tức được phân tách và được nhuộm màu allophycocyanin (APC) liên hợp với kháng thể kháng Fc người (hFc-APC). Các tế bào đã nhuộm được rửa 3 lần dưới dòng chảy PBS chứa 2% huyết thanh thai bê và 0,1% natri azit. Các khối u ở thời điểm 10 phút và 4 giờ sau khi tiêm kháng thể được cố định qua đêm và sau đó được đo bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy. Các khối u được thu tại thời điểm 24 giờ sau khi tiêm kháng thể được đo luôn mà không cần cố định. Tất cả mẫu được thu thập trên thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy ACCURI® C6 FLOW

CYTOMETER® (Accuri Cytometers, Inc.) và đo cường độ huỳnh quang trung bình (mean fluorescence intensity MFI). Các kết quả thu được được trình bày trong Bảng 12. Giá trị MFI là giá trị trung bình sau khi lập lại 2-3 lần $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (standard error of the mean-SEM)

Bảng 12

Thời gian sau khi tiêm kháng thể	MFI $\pm$ SEM (U87/EGFRvIII)	
	Đối chứng isotyp	H1H1863N2(Fuc-)
10 phút	708 $\pm$ 4	2259 $\pm$ 115
4 giờ	741 $\pm$ 34	10620 $\pm$ 2881
24 giờ	664 $\pm$ 34	27923 $\pm$ 3297

So với đối chứng isotyp, kháng thể H1H1863N2(Fuc-) liên kết với tế bào khối u U87/EGFRvIII một cách hiệu quả theo phương thức phụ thuộc vào thời gian.

Ví dụ 10: Khả năng liên kết của kháng thể kháng EGFRvIII với khối u ghép ngoại lai B16F10.9/EGFRvIII

Chuột suy giảm miễn dịch nghiêm trọng (SCID) được cấy ghép với năm mươi nghìn tế bào u ác tính chuột B16F10.9 hoặc B16F10.9 biểu hiện quá mức EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII). Các tế bào B16F10.9/EGFRvIII được tạo ra như đã mô tả cho tế bào HEK293/EGFRvIII trong ví dụ 7. Các tế bào B16F10.9 biểu hiện xấp xỉ $1,5 \times 10^5$ bản sao EGFRvIII trên mỗi tế bào được sử dụng trong thử nghiệm. Cho các khối u cho phát triển trong khoảng 14 ngày, cho đến khi đạt được kích thước trung bình 200-300 mm³ thì tiến hành thu khối u. Tiêm H1H1863N2(Fuc-) hoặc đối chứng isotyp qua tĩnh mạch đuôi của chuột. Sau khi tiêm kháng thể 10 phút, 4 giờ, và 24 giờ, giết chết chuột và lấy khối u ra và đặt vào PBS. Các khối u ngay lập tức được phân tách và nhuộm với allophycocyanin (APC) liên hợp với kháng thể kháng Fc người (hFc-APC). Các tế bào đã nhuộm được rửa 3 lần dưới dòng chảy PBS (1xPBS, 2% huyết thanh bào thai bê, 0,1% natri azit), được cố định và thẩm thấu bằng các phương pháp tiêu chuẩn. Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để phát hiện H1H1863N2(Fuc-) gắn trên bề mặt tế bào và tiến hành phân tích bằng phần mềm FlowJo (Tree Star, Inc.). Các kết quả được trình bày trong Bảng 13 và Fig.4a. Để phát hiện cả kháng thể liên kết nội bào và kháng thể gắn trên bề mặt, các tế bào được nhuộm lần thứ hai bằng cùng một kháng thể kháng Fc người (hFc-APC), sau đó được cố định và thẩm thấu. Bước này giúp phát hiện ra kháng thể nội bào. Các kết quả được trình bày trong Bảng 14 và Fig

4b. Tất cả mẫu được thu thập trên thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® (Accuri Cytometers, Inc.) và đo cường độ huỳnh quang trung bình (MFI). Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của mỗi mẫu được ghi lại sau khi trừ đi MFI của đối chứng không màu. Giá trị MFI là giá trị trung bình sau khi lặp lại thử nghiệm hai lần ($N=2$) $\pm$ sai số chuẩn của trung bình (SEM). * $N=1$ cho thời điểm này.

Bảng 13

Thời gian sau tiêm	MFI $\pm$ SEM (B16F10.9/EGFRvIII) – Nhuộm bề mặt			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	Đối chứng isotyp	H1H1863N2(Fuc-)	Đối chứng isotyp	H1H1863N2(Fuc-)
10 phút	74 $\pm$ 67	56 $\pm$ 2	128 $\pm$ 49	2003 $\pm$ 216
4 giờ	80 $\pm$ 15	195 $\pm$ 52	54 $\pm$ 21	4224 $\pm$ 610
24 giờ	79 $\pm$ 21	155 $\pm$ 42	72*	5692 $\pm$ 595

Bảng 14

Thời gian Sau tiêm	MFI $\pm$ SEM (B16F10.9/EGFRvIII) – Nhuộm bề mặt			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	Đối chứng isotyp	H1H1863N2(Fuc-)	Đối chứng isotyp	H1H1863N2(Fuc-)
10 phút	132 $\pm$ 92	117 $\pm$ 18	155 $\pm$ 44	2627 $\pm$ 192
4 giờ	165 $\pm$ 22	422 $\pm$ 106	120 $\pm$ 22	7785 $\pm$ 782
24 giờ	135 $\pm$ 11	281 $\pm$ 51	132*	9578 $\pm$ 852

H1H1863N2(Fuc-) liên kết hiệu quả vào bề mặt tế bào B16F10.9 biểu hiện EGFRvIII theo phương thức phụ thuộc vào thời gian, trong khi khả năng liên kết của đối chứng isotyp là nhỏ nhất. Việc tang liên kết tổng số (tức là, liên kết bề mặt tế bào cộng liên kết nội bào) của H1H1863N2(Fuc-) so với chỉ liên kết bề mặt tế bào, cho thấy rằng các kháng thể liên kết bề mặt tế bào cũng được nội bào hóa một cách hiệu quả bởi tế bào B16F10.0.

Ví dụ 11: Dược động học của kháng thể kháng EGFRvIII ở chuột

Để xác định tính chọn lọc *in vivo* của kháng thể kháng EGFRvIII, nghiên cứu dược động học sử dụng chuột kiểu dại (“chuột WT”) biểu hiện tự nhiên EGFR chuột, và chuột có EGFR được nhân hóa (“chuột hEGFR”) biểu hiện EGFR người. Chuột từ các chủng lai bao gồm C57BL6 (chiếm 75%) và 129Sv (chiếm 25%). Mỗi nhóm gồm 5 con hoặc chuột WT hoặc chuột hEGFR. Tất cả các kháng thể đều được tiêm dưới da với liều lượng 0,2 mg/kg. Máu được lấy tại các thời điểm 0 giờ, 6 giờ, 1 ngày, 2 ngày,

3 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 21 ngày, và 30 ngày sau khi cung cấp kháng thể. Nồng độ huyết thanh của kháng thể người được xác định bằng phương pháp ELISA sandwich. Tóm lại, kháng thể đa dòng kháng IgG người (đặc hiệu Fc) (Jackson ImmunoResearch) được phủ trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$ và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi các đĩa được phong bế bằng BSA, các mẫu huyết thanh trong dung dịch pha loãng sáu lần liên tiếp và chuẩn tham chiếu của các kháng thể tương ứng trong các dung dịch pha loãng mười hai lần liên tiếp được thêm vào đĩa và ủ trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa để loại bỏ kháng thể không liên kết, các kháng thể người bị bắt giữ được phát hiện bằng kháng thể đa dòng kháng dê IgG người (đặc hiệu Fc) liên hợp với peroxidaza củ cải ngược (HRP) (Jackson ImmunoResearch) và bộc lộ bởi cơ chất chỉ thị màu tiêu chuẩn tetramethylbenzidin (TMB) theo như hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm được ghi lại trên máy đọc đĩa và nồng độ hIgG trong mẫu huyết thanh được tính toán dựa vào đường cong tham chiếu chuẩn được tạo ra trong đĩa mẫu. Kháng thể kháng người của chuột (MAHA) được đo bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn và thường ở mức thấp.

Fig. 5A-5D cho thấy nồng độ kháng thể theo thời gian của bốn kháng thể được thử nghiệm. Đối chứng IV (“Mab C225”) được biết là có khả năng liên kết với EGFR người nhưng không liên kết với EGFR chuột. Như mong đợi, kháng thể này thanh thải nhanh ở chuột hEGFR và thanh thải chậm (tức là, thanh thải không qua đích-trung gian) ở chuột WT (Fig.5a). Đối chứng I (“Mab 13.1.2”) được biết đến là có khả năng liên kết với peptit nối EGFRvIII “LEEKKGNVVTVDH” không xuất hiện trong EGFR người hoặc chuột. Kháng thể này không liên kết với EGFR người hoặc chuột *in vivo*. Như mong đợi, kháng thể này có tỷ lệ thanh thải được động học chậm giống hệt nhau ở cả hai loại chuột (Fig.5b) và cũng quan sát thấy thanh thải không qua đích-trung gian. Kháng thể đối chứng III (“Mab hu806”) cho thấy thanh thải tăng lên ở chuột hEGFR so với chuột WT (Fig.5c). Kết quả này phù hợp với khả năng liên kết hEGFR *in vitro* của nó như được xác định bằng Biacore (tham khảo, ví dụ 3, Bảng 4) và phương pháp phân loại tế bào thông qua phát xạ phát huỳnh quang (FACS) (ví dụ 7, Bảng 9). Fig.5 thể hiện thanh thải của H1H1863N2(Fuc+). Kháng thể này, tương tự như đối chứng I, có thị tỷ lệ thanh thải chậm như nhau ở cả hai loại chuột. Do đó, H1H1863N2 không liên kết với EGFR người hoặc chuột trong điều kiện *in vivo*.

Ví dụ 12: Liên hợp thuốc-kháng thể kháng EGFRvIII ức chế sự phát triển khối u trong mô hình dị ghép ung thư vú dương tính với EGFRvIII *in vivo*

Trong ví dụ này, hai liên hợp kháng thể-thuốc khác nhau của kháng thể kháng EGFRvIII H1H1863N2 được kiểm tra khả năng ức chế sự phát triển khối u *in vivo*. Liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) đầu tiên được tạo ra bằng cách liên hợp H1H1863N2 với độc tố maytansinoid DM1 thông qua một cầu nối không thể cắt MCC (xem, ví dụ, US 5,208,020 và đơn sáng chế Mỹ 2010/0129314) để tạo ra "H1H1863N2-MCC-DM1". Liên hợp kháng thể-thuốc ADC thứ hai được tạo ra bằng cách liên hợp H1H1863N2 với phiên bản đã bị biến đổi của DM1 gắn vào cầu nối có thể cắt mới, còn được gọi là "M0026" (cũng được biết tới như là "hợp chất 7" trong công bố quốc tế WO2014/145090, công bố được đưa vào đây bằng cách tham chiếu đến toàn bộ), để thu được "H1H1863N2-M0026". Khi kiểm tra khả năng gây độc tế bào *in vitro* chống lại tế bào MMT/EGFRvIII, H1H1863N2-MCC-DM1 có giá trị IC₅₀ là 12nM trong khi H1H1863N2-7 có giá trị IC₅₀ là 0,8nM trên đương lượng thuốc.

Để so sánh hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng EGFRvIII liên hợp với DM1 và M0026, các nghiên cứu được tiến hành trên chuột suy giảm miễn dịch mang dị ghép ung thư vú dương tính với EGFRvIII.

Tóm lại, dị ghép khối u được tạo ra bằng cách cấy dưới da $0,5 \times 10^6$ tế bào MMT/EGFRvIII vào sườn trái của chuột cái CB17 SCID (Taconic, Hudson, NY). Khi khối u đạt thể tích trung bình là 140 mm³ (tương đương với ngày thứ 8), chuột được chọn ngẫu nhiên vào nhóm 7 con chuột, và được cung cấp ADC kháng EGFRvIII theo liều sử dụng định dạng liên hợp-thuốc MCC-DM1 hoặc M0026. Các thuốc thử đối chứng, bao gồm các ADC không liên kết sử dụng hoặc định dạng liên hợp-thuốc MCC-DM1 hoặc M0026, và tá dược lỏng PBS cũng được đánh giá. Các liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) được cung cấp với liều lượng 1 và 5 mg/kg ba lần một tuần và sau đó theo dõi đến khi thu được khối u có kích thước trung bình đạt khoảng 2000 mm³ trong nhóm chỉ cung cấp tá dược lỏng. Tại thời điểm này, việc ức chế phát triển khối u được tính như mô tả dưới đây.

Kích thước khối u trung bình đối với nhóm được điều trị bằng tá dược lỏng được tính như sau: các khối u được đo bằng thước kẹp hai lần một tuần cho đến khi kích thước khối u trung bình của nhóm tá dược lỏng đạt 1000 mm³; kích thước khối u được tính theo công thức (chiều dài x chiều rộng²)/2. Ức chế phát triển khối u được

tính theo công thức sau: $(1 - ((T_{\text{cuối}} - T_{\text{đầu}}) / (C_{\text{cuối}} - C_{\text{đầu}}))) * 100$, trong đó T (nhóm được điều trị) và C (nhóm đối chứng) tương ứng với khối lượng khối u trung bình của nhóm sử dụng tá được lồng vào ngày mà kích thước khối u trung bình đạt đến 1000 mm³. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 15.

Bảng 15

Nhóm điều trị	Kích thước khối u cuối cùng vào ngày thứ 8 mm ³ (trung bình $\pm$ SD)	ức chế phát triển khối u trung bình (%)
Tá được lồng PBS	2253 $\pm$ 217	0
1mg/kg Đối chứng-MCC-DM1	2827 $\pm$ 278	-27
5mg/kg Đối chứng-MCC-DM1	2402 $\pm$ 256	-7
1mg/kg đối chứng M0026	2729 $\pm$ 470	-22
5mg/kg đối chứng M0026	2787 $\pm$ 503	-25
1mg/kg H1H1863N2-MCC-DM1	931 $\pm$ 292	62
5mg/kg H1H1863N2-MCC-DM1	471 $\pm$ 227	84
1mg/kg H1H1863N2-M0026	679 $\pm$ 265	74
5mg/kg H1H1863N2-M0026	96 $\pm$ 34	102

Như được tóm tắt trong Bảng 15, ức chế sự phát triển khối u tốt nhất được quan sát thấy ở những con chuột được cung cấp 5 mg/kg H1H1863N2-M0026, nơi lần đầu tiên quan sát thấy hiện tượng suy giảm của khối u. Khả năng ức chế sự phát triển khối u ở chuột được cung cấp 5 mg/kg H1H1863N2-M0026 là 102%, kết quả này lớn hơn đáng kể so với khi khối u được điều trị bằng 5 mg/kg H1H1862N2-MCC-DM1 (83%). Khả năng ức chế sự phát triển khối u của H1H1863N2-M0026 vượt trội hơn so với H1H1863N2-MCC-DM1 tại liều lượng 1 mg/kg. Không thấy có hiệu quả ức chế khối u nào ở nhóm điều trị với đối chứng ADC sử dụng MCC-DM1 hoặc M0026.

Do đó, ví dụ này cho thấy rằng các kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế, khi được cung cấp dưới dạng liên hợp kháng thể-thuốc, có khả năng ức chế sự phát triển của khối u. Ngoài ra, ví dụ này củng cố thêm vai trò của ADC theo sáng chế rằng nó thực sự thúc đẩy làm giảm khối u, đặc biệt là trong phạm vi kháng thể kháng EGFRvIII theo sáng chế (ví dụ, H1H1863N2) liên hợp với phân tử thuốc/cầu nối mới M0026.

Phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án cụ thể được mô tả ở đây. Thực vậy, các biến thể của sáng chế được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng hơn với những người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật từ những mô tả và các

hình vẽ kèm theo. Các biến thể như vậy đều nằm trong phạm vi của sáng chế trong phần yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 13: Kháng thể kháng EGFRvIII-DM1 thể hiện tính đặc hiệu đối với tế bào biểu hiện EGFRvIII và chứng minh tiềm năng hoạt tính tiêu diệt tế bào

Trong ví dụ này, khả năng của kháng thể kháng EGFRvIII người liên hợp với độc tố maytansin DM1 trong việc giảm khả năng sống sót của tế bào được xác định sử dụng thử nghiệm trên cơ sở tế bào *in vitro*.

EGFRvIII người (SED ID No.:147) có chiều dài đầy đủ hoặc EGFR người kiểu dại (SED ID No.:146) được đưa ổn định vào các dòng tế bào HEK293 (293/hEGFRvIII, 293/hEGFRwt), U251 (U251/hEGFRvIII) và MMT 060562 (MMT/hEGFRvIII). Tất cả tế bào được tạo ra thông qua phương pháp trên cơ sở lipofectamin 2000 và được nuôi cấy trong môi trường phát triển hoàn toàn với sự có mặt của G418.

Biểu hiện bề mặt tế bào của EGFR wt hoặc EGFRvIII được đo bằng phương pháp FACS. Tóm lại, 1×10^6 tế bào được ủ với 10 $\mu\text{g/ml}$ kháng thể kháng EGFRvIII H1H1863N2, và mAb đối chứng kháng EGFRwt (đối chứng IV) hoặc đối chứng isotyp trong 30 phút trên đá trong dung dịch đệm pha loãng kháng thể. Sau khi rửa hai lần với dung dịch đệm pha loãng kháng thể, các tế bào được ủ với 10 $\mu\text{g/ml}$ PE liên hợp với kháng thể thứ hai kháng người trong 30 phút trên đá. Sau khi rửa thêm hai lần, các mẫu được chạy trên máy đếm tế bào Accuri C6 (BD) hoặc Hypercyt (Intellicyt) và phân tích dữ liệu bằng phần mềm FlowJo. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 16. n.d= không xác định.

Bảng 16: Biểu hiện trên bề mặt tế bào của các dòng tế bào được chuyển gen EGFRwt và EGFRvIII

Dòng tế bào	Liên kết FACS (lần MFI trên đối chứng isotyp)				
	Không được nhuộm	H1H1863N2 (kháng EGFRvIII)	Đối chứng IV (kháng EGFRwt)	Một mình kháng thể thứ cấp	Đối chứng isotyp
HEK293	1X	1X	49x	1X	1X
HEK293/hEGFRwt	1X	n.d.	332x	1X	1X
HEK293/hEGFRvIII	1X	264X	n.d.	1X	1X
U251	1X	1X	n.d.	1X	1X

U251/hEGFRvIII	1X	13X	n.d.	1X	1X
MMT/	1X	1X	n.d.	1X	1X
MMT/hEGFRvIII	1X	280X	n.d.	1X	1X

Các kết quả này cho thấy rằng biểu hiện EGFRvIII trên bề mặt ở hai dòng tế bào HEK293/hEGFRvIII và MMT/hEGFRvIII là có thể so sánh được, bởi vì mức độ biểu hiện của U251/EGFRvIII thấp hơn khoảng 20 lần so với ở hệ thống tế bào HEK293/hEGFRvIII và MMT/hEGFRvIII. Không thấy EGFRvIII liên kết qua H1H1863N2 trong các dòng tế bào bố mẹ. Ngược lại, kháng thể đối chứng kháng EGFR wt (đối chứng V) liên kết với tế bào mẹ HEK293 lớn hơn 49 lần so với đối chứng isotyp. Việc sáp nhập ổn định của vector biểu hiện EGFRwt vào tế bào HEK293 làm tăng biểu hiện đến 332 lần trên nền và có thể so sánh với biểu hiện EGFRvIII ở tế bào HEK293/hEGFRvIII và MMT/hEGFRvIII.

Tính liên kết chọn lọc của kháng thể kháng EGFRvIII H1H1863N2 với EGFRvIII được đánh giá bằng phương pháp FACS sử dụng các dòng tế bào HEK293 bố mẹ, HEK293/hEGFRwt, HEK293/hEGFRvIII, và A431. Các kết quả được trình bày trong Bảng 17.

Bảng 17: Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể kháng EGFRvIII với dòng tế bào biểu hiện EGFRvIII

mAb	Liên kết FACS (số lần MFI lớn hơn so với đối chứng isotyp)			
	HEK293	HEK293/EGFRwt	HEK293/EGFRvIII	A431
Đối chứng IV (kháng EGFRwt)	83	251	855	621
H1H1863N2 (kháng EGFRvIII)	1	3	662	13
Đối chứng isotyp	1	1	1	1
Một mình kháng thể thứ hai	1	1	1	1
Tế bào không được nhuộm	1	1	1	1

Như thấy trong Bảng 17, cả kháng thể H1H1863N2 và kháng thể đối chứng kháng EGFRwt (đối chứng IV) đều thể hiện khả năng liên kết mạnh (>650 lần) với tế bào HEK293/EGFRvIII so với đối chứng isotyp. Ngược lại, H1H1863N2 thể hiện khả

năng liên kết yếu với dòng tế bào wt-EGFR HEK293 (3 lần) và dòng tế bào biểu hiện nội sinh EGFR A431 (13 lần trên đối chứng). Kháng thể đối chứng kháng EGFRwt liên kết mạnh với tế bào biểu hiện EGFR kiểu dại, điều này chứng thực cho tính chọn lọc của H1H1863N2 đối với EGFRvIII mạnh hơn so với EGFR kiểu dại.

Tiếp theo, khả năng liên hợp của kháng thể kháng EGFRvIII với độc tố maytansin DM1 để giảm khả năng sống sót của tế bào được xác định bằng các thử nghiệm trên cơ sở tế bào trong điều kiện *in vitro*. Các tế bào được cấy vào trong đĩa 96 giếng phủ PDL với mật độ 250-2000 tế bào trên một giếng trong môi trường phát triển hoàn toàn và được nuôi qua đêm. Đối với đường cong về khả năng sống sót của tế bào, các ADC hoặc chất không thuốc (DM1-SMe) được thêm vào tế bào với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 500 nM đến 5 pM và ủ trong 3 ngày. Các tế bào được ủ với CCK8 (Dojindo) trong 1-3 giờ cuối cùng và đo độ hấp thụ tại bước sóng 450nm (OD₄₅₀) trên Flexstation3 (Thiết bị phân tử). Mức OD₄₅₀ cơ sở từ các tế bào được xử lý digitonin (40 nM) được loại trừ ra khỏi tất cả các giếng và khả năng sống sót được biểu hiện như tỷ lệ phần trăm của đối chứng không được xử lý. Giá trị IC₅₀ được xác định từ phương trình log bốn tham số trên đường cong phản ứng 10 điểm (GraphPad Prism). Kết quả thu được được trình bày trong Bảng 18A và Bảng 18B. Các giá trị IC₅₀ được tính bằng nM và được chuẩn hóa cho một tỷ lệ thuốc/kháng thể (drug/antibody ratio-DAR) cụ thể.

Bảng 18A: Khả năng tiêu diệt tế bào của liên hợp kháng thể-thuốc bao gồm kháng thể kháng EGFRvIII-DM1

Dòng tế bào	HEK293		HEK293/hEGFRvIII		HEK293/hEGFRwt		U251	
ADC	IC ₅₀ (nM)	% bị tiêu diệt	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt	IC ₅₀ (nM)	% bị tiêu diệt	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt
H1H1863N2-MCC-DM1	>100	90	1	97	>100	91	48	77
Kháng-EGFRwt-MCC-DM1	76	94	0,2	97	~1,0	94	ND	ND
DM1-SMe	0,31	97	0,6	99	0,57	95	1,8	81
Đối chứng isotyp MCC-DM1	>100	92	>100	96	>100	91	40	77

Bảng 18B: Khả năng tiêu diệt tế bào của liên hợp kháng thể-thuốc bao gồm kháng thể kháng EGFRvIII-DM1

Dòng tế bào	U251/hEGFRvIII		MMT		MMT/hEGFRvIII	
ADC	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt
H1H1863N2-MCC-DM1	4	78	>150	40	3	100
Kháng-EGFRwt-MCC-DM1	KXĐ	KXĐ	KXĐ	KXĐ	KXĐ	KXĐ
DM1-SMe	1,2	83	0,6	96	0,7	100
Đối chứng isotyp MCC-DM1	35	76	>150	66	KTD	72

Như đã chỉ ra trong Bảng 18A và 18B, H1H1863N2-MCC-DM1 làm giảm khả năng sống sót của các dòng tế bào HEK293/hEGFRvIII, U251/hEGFRvIII, và MMT/hEGFRvIII với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 1,0 đến 4,0 nM. Ngược lại, đối chứng isotyp liên hợp với DM1 làm giảm khả năng sống sót của tế bào 293/EGFRvIII và MMT/hEGFRvIII với IC₅₀ lớn hơn 100nM và tế bào U251/hEGFRvIII với IC₅₀ là 35 nM. H1H1863N2-MCC-DM1 không tác động lên tế bào HEK293 biểu hiện EGFR kiểu dại (293/hEGFRwt) hoặc dòng tế bào bố mẹ đối chứng, điều này cho thấy tính đặc hiệu với các tế bào biểu hiện EGFRvIII.

Vì vậy, ví dụ này chứng minh rằng kháng thể EGFRvIII H1H1863N2 có tính đặc hiệu với các dòng tế bào biểu hiện EGFRvIII và chứng minh khả năng tiêu diệt tế bào cụ thể khi liên hợp với độc tố DM1.

Ví dụ 14: Khả năng tiêu diệt tế bào được cải thiện khi liên hợp kháng thể-thuốc chứa kháng thể có liên kết cấu dạng với EGFRvIII được cung cấp kết hợp với liên hợp kháng thể-thuốc chứa kháng thể có liên kết peptit nối EGFRvIII

Trong ví dụ này, nghiên cứu xác định khả năng tăng cường tiêu diệt tế bào bằng việc đồng cung cấp hai loại liên hợp kháng thể-thuốc kháng EGFRvIII khác nhau. Theo ví dụ này, các tổ hợp được thử nghiệm bao gồm hai kháng thể kháng EGFRvIII khác nhau: (1) kháng thể đặc hiệu kháng EGFRvIII không nhận ra ADC peptit nối EGFRvIII (còn được gọi là “cầu nối cấu dạng”); và (2) kháng thể đặc hiệu kháng EGFRvIII nhận ra peptit nối EGFRvIII (còn được gọi là “cầu nối peptit”). Như

đã trình bày trong ví dụ 6, kháng thể kháng EGFRvIII H1H1863N2 không liên kết với peptit nối EGFRvIII hoặc các gốc 311-326 của EGFR người và do đó, được coi như là “cầu nối cấu dạng”.

Cạnh tranh chéo trong điều kiện *in vitro*

Đầu tiên, khả năng H1H1863N2 cạnh tranh chéo với một kháng thể liên kết với peptit nối EGFRvIII được xác định thông qua thử nghiệm cạnh tranh liên kết. Peptit nối liên kết với kháng thể kháng EGFRvIII được sử dụng trong ví dụ này là đối chứng V.

Cạnh tranh chéo được xác định bằng cách sử dụng xét nghiệm giao thoa lớp sinh học không nhãn (BLI), thời gian thực trên bộ cảm biến sinh học Octet HTX (ForteBio Corp., A Division of Pall Life Sciences). Toàn bộ thử nghiệm được tiến hành tại nhiệt độ 25°C trong dung dịch đệm bao gồm 0,01M HEPES pH7,4; NaCl 0,15M; 3mM EDTA; chất hoạt động bề mặt 0,05% thể tích/thể tích P20; 1,0mg/mL BSA (đệm Octet HBST) trên đĩa được lắc ở tốc độ 1000 vòng/phút. Để đánh giá liệu hai kháng thể có cạnh tranh chéo để liên kết vào EGFRvIII người tái tổ hợp (hEGFRvIII.mmh; SEQ số:152), khoảng ~0,35nm hEGFRvIII.mmh được bắt giữ trên các cảm biến sinh học Octet phủ kháng-peta-His. Các cảm biến sinh học bắt giữ kháng nguyên sau đó được thấm dẫm với kháng thể đơn dòng kháng EGFRvIII thứ nhất (sau đây được gọi là mAb-1) bằng cách ngâm chúng vào các giếng chứa 50µg/mL dung dịch mAb-1 trong 5 phút. Các cảm biến sinh học sau đó được nhúng vào trong các giếng chứa 50µg/mL dung dịch kháng thể đơn dòng kháng EGFRvIII thứ hai (sau đây gọi là mAb-2) trong 3 phút. Tất cả các cảm biến sinh học được rửa sạch với đệm Octet HBST giữa mỗi bước thử nghiệm. Phản ứng liên kết thời gian thực được theo dõi trong suốt quá trình tiến hành thử nghiệm và phản ứng gắn ở cuối mỗi bước được ghi lại. Phản ứng của mAb-2 gắn tiền phức hEGFRvIII với mAb-1 được so sánh và hành vi cạnh tranh/không cạnh tranh của kháng thể đơn dòng kháng EGFRvIII khác nhau được xác định.

Bằng cách sử dụng mô hình thử nghiệm cạnh tranh chéo này, H1H1863N2 không cạnh tranh chéo với cầu nối peptit nối EGFRvIII được thử nghiệm, cũng không cạnh tranh chéo để liên kết EGFRvIII với đối chứng II hoặc đối chứng IV. Do đó, các kết quả thu được của thử nghiệm cạnh tranh chéo này chỉ ra rằng, H1H1863N2 có epitop liên kết riêng biệt với epitop của chất gắn peptit cầu nối EGFRvIII, cũng như

đối chứng II và IV.

Hoạt tính tiêu diệt tế bào của liên hợp kháng thể-thuốc kháng EGFRvIII riêng lẻ

Tiếp theo, tiến hành đánh giá khả năng liên kết của H1H1863N2-MCC-DM1 và ADC với peptit kháng EGFRvIII làm giảm khả năng sống sót của tế bào khi được cung cấp cùng nhau. Khả năng tiêu diệt tế bào của đối chứng V khi liên hợp với SMCC-DM1 (tức là, đối chứng V-MCC-DM1) được xác định bằng sử dụng tế bào *in vitro* trên thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 13. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 19.

Bảng 19: Khả năng tiêu diệt tế bào của liên hợp kháng thể-thuốc gồm kháng thể kháng EGFRvIII-DM1

Dòng tế bào	HEK293		HEK293/hEGFRvIII (cao)		MMT		MMT/hEGFRvIII (cao)	
ADC	IC50	% tiêu diệt	IC50	% tiêu diệt	IC50	% tiêu diệt	IC50	% tiêu diệt
DM1-SMe (không DM1)	0,19	98	0,25	99	0,15	100	0,18	99
Đối chứng isotyp MCC- DM1	200	91	150	92	110	68	250	72
H1H1863N2- MCC-DM1	80	97	0,37	99	200	95	3,25	97
Đối chứng V-MCC- DM1	90	95	0,25	100	200	89	0,35	97

Như nêu trong Bảng 19, các ADC kháng EGFRvIII làm giảm khả năng sống sót của tế bào trên nhiều dòng tế bào biểu hiện quá mức EGFRvIII với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,25 nM đến 3,25 nM.

Hoạt tính tiêu diệt tế bào của liên hợp kháng thể-thuốc kháng EGFRvIII theo cặp

Tiếp theo, tiến hành đánh giá khả năng tiêu diệt tế bào của H1H1863N2-MCC-DM1 bắt cặp với ADC liên kết với peptit kháng EGFRvIII trên dòng các tế bào biểu hiện quá mức EGFRvIII theo tỷ lệ 1:1. Các kết quả được trình bày trong Bảng 20.

Bảng 20: Khả năng tiêu diệt tế bào của tổ hợp các ADC kháng-EGFRvIII-DM1 theo cặp

Dòng tế bào:		HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
ADC 1	ADC 2	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt	IC ₅₀ (nM)	% tiêu diệt
H1H1863N2-MCC-DM1	Không có	250	87	1,52	95	250	59	11,1	98
Đối chứng V-MCC-DM1	Không có	100	85	0,14	98	100	67	0,7	95
H1H1863N2-MCC-DM1	Đối chứng V-MCC-DM1	100	91	0,19	99	200	98	0,58	100
DM1-SMe (không DM1)	Không có	0,21	96	0,28	97	0,19	100	0,19	100
Đối chứng isotyp MCC-DM1	Không có	200	93	95	93	150	32	100	36

Như được tóm tắt trong bảng 20, việc sử dụng kết hợp H1H1863N2-MCC-DM1 (một chất liên kết epitop cấu dạng) với đối chứng V-MCC-DM1 (một chất liên kết peptit cầu nối) có khả năng tiêu diệt tế bào, ít nhất là tương đương với, hoặc trong một số trường hợp nhất định, cao hơn so với việc điều trị chỉ dùng ADC. Việc thiếu sự kết hợp giữa hai loại kháng thể cho thấy việc sử dụng hiệu quả của hai kháng thể không cạnh tranh với các chất gây độc tế bào khác nhau, hoặc các nhóm chất gây độc tế bào khác nhau có cơ chế hoạt động riêng biệt.

Tóm lại, ví dụ này chứng minh rằng H1H1863N2 không cạnh tranh chéo với kháng thể gắn peptit EGFRvIII đối chứng. Epitop duy nhất này cho phép tổ hợp của nó với ADC gắn peptit EGFRvIII làm cải thiện khả năng tiêu diệt tế bào. Tổ hợp mới này của các ADC EGFRvIII có thể mang lại hiệu quả điều trị tốt hơn.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
 <120> KHÁNG THỂ KHÁNG BIẾN THỂ NHÓM III CỦA THỤ THỂ YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG BIỂU
 BÌ (EGFRvIII) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> A0020W001
 <140> Được chuyển nhượng
 <141> Được nộp kèm theo đây
 <150> 61/950,963
 <151> 2014-03-11
 <160> 165
 <170> FastSEQ cho window phiên bản 4.0
 <210> 1
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 1
 cagggtgcagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtaaaagtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120
 actggacagg ggcttgagt gatgggatgg attaaccta acagtgatta cacaggctat 180
 gtacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cctccataag tacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gacatcacgg 300
 tggctctgaac acttccacca ctggggccag ggcaccctgg tcactgtctc ctca 354
 <210> 2
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Val Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Ser Arg Trp Ser Glu His Phe His His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 3

ggatacacct tcaccagtta tgat

24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp

1

5

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 5

attaacccta acagtgatta caca

24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 6

Ile Asn Pro Asn Ser Asp Tyr Thr

1

5

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 7

gcgacatcac ggtggtctga acattccac cac

33

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 8

Ala Thr Ser Arg Trp Ser Glu His Phe His His

1 5 10
 <210> 9
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 9
 gacatcgatga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagggtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtaccagc acaaaccagg acagcctcct aacctactca ttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttatagtact 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaac ga 342

<210> 10
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 10
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110
 Lys Arg

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 11
 cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac 36

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp

<400> 12
 Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 13
 tgggcatct

9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 14
 Trp Ala Ser
 1

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 15
 caccaatatt atagtactcc attcact

27

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 16
 His Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 17

<211> 372
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 17
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc ccggagactc 60
 tcctgtgtag tgtctggatt catcttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atattttatg atggaagtaa tgaatactat 180
 gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
 ctccaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgagagggc 300
 tacagtcagc ggtacaagta ttacttcggg atggacgtct ggggccaagg gaccacggctc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 18
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Arg Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Leu Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Val 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 Arg Glu Gly Tyr Ser Gln Arg Tyr Lys Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 19
 ggattcatct tcagtagcta tggc

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 20

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 21

atatatttatg atggaagtaa tgaa

24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 22

Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Glu

1

5

<210> 23

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 23

gcgcgagagg gctacagtca gcggtacaag tattacttcg gtatggacgt c

51

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 24

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Gln Arg Tyr Lys Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1

5

10

15

Val

<210> 25
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 25
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggtatttag agctggtttag cctgggtatca gcagcaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tcccgcctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 26
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 26
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 27
 cagggtatta gcagctgg

18

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 28

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1

5

<210> 29

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 29

gctgcatcc

9

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 30

Ala Ala Ser

1

<210> 31

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 31

caacagacta acagtttccc gctcact

27

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 32

Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 33

<211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 33
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt agctacgaca tgcactgggt ccgccaagct 120
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg ctggtgccac atactatcca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag aggggattac 300
 gtttggggga cttatcgtcc cctctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 34
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val 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 Pro Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Thr Ala Gly Ala Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Asp Tyr Val Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Leu Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 35
 ggattcccct tcagtagcta cgac

24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 36

Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr Asp

1

5

<210> 37

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 37

attggtactg ctggtgccac a

21

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 38

Ile Gly Thr Ala Gly Ala Thr

1

5

<210> 39

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 39

gcaagagggg attacgtttg ggggacttat cgtcccctct ttgactac

48

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 40

Ala Arg Gly Asp Tyr Val Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Leu Phe Asp Tyr

1

5

10

15

<210> 41

<211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 41
 gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggccagtca gggcattaac aattatcttag cctgggtatca acaaaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaactgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcagcag cttaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 42
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 43
 cagggcatta acaattat 18

<210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 44

Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 45

gctgcatcc

9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 46

Ala Ala Ser
1

<210> 47

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 47

cagcagctta atagttaccc gtcact

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 48

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 49

<211> 372

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 49

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agatatggca tacactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttggcatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga ccagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgga 300
ctggagatac gagatcacta ctactacggt atggacgtct gggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

```

<210> 50

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 50

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20          25          30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Val Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys 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 Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Asp Gly Leu Glu Ile Arg Asp His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100          105          110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 51

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 51

ggattcacct tcagtagata tggc

24

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly
1 5

<210> 53

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 53

atttggcatg atggaagtaa taaa

24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 54

Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 55

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 55

gcgagagatg gactggagat acgagatcac tactactacg gtatggacgt c

51

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 56

Ala Arg Asp Gly Leu Glu Ile Arg Asp His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 57

<211> 321

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 57
gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat cggtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gactactagt agttggttgg cctgggtatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctacgctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aaattcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgatTTTT caacgtatta ctgccaacag tataacaggt attctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaattaa a 321

<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Thr Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 59
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 59
cagagtacta gtagttgg 18

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 60
Gln Ser Thr Ser Ser Trp
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 61
aaggcgtct

9

<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 62
Lys Ala Ser
1

<210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 63
caacagtata acaggtattc tcggacg

27

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 64
Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 65
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 65

```

gaagtgcagt tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgccca tgcactgggt cgggcaagtt 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga atagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatata 300
catgactacg gaaaagatta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccc tctcctca                                     378

```

<210> 66

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 66

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20           25           30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85           90           95
Ala Lys Asp Ile His Asp Tyr Gly Lys Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100          105          110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120          125

```

<210> 67

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 67

```

ggattcacct ttgatgatta tgcc                                     24

```

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala

1

5

<210> 69

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 69

attagttgga atagtggttag cata

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 70

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile

1

5

<210> 71

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 71

gcaaaaagata tccatgacta cggaaaagat tactactact actacggtat ggacgtc

57

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 72

Ala Lys Asp Ile His Asp Tyr Gly Lys Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

1

5

10

15

Met Asp Val

<210> 73

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 73

```

gaaattgcgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcacctatt tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata gttcaccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

```

<210> 74

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 74

```

Glu Ile Ala 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 Thr
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 Tyr Asp Ser Ser Pro
85          90          95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100         105

```

<210> 75

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 75

cagagtgtta gcagcaccta t

21

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 76

Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 77

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 77

ggtgcatcc

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 78

Gly Ala Ser
1

<210> 79

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 79

cagcagtatg atagttcacc gatcacc

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 80

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Ile Thr
1 5

<210> 81

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 81

```
cagggtgcagc tgggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt gcctatgcca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagt ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaaaattat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcta 300
atggtcggag ttactaacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc caca 354
```

<210> 82

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 82

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

<210> 83

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 83

```
ggattcacct tcagtgccta tgcc
```

24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala
1 5

<210> 85
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 85
atatggtatg atggaagtaa taaa

24

<210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 86
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 87
gcgagagatc taatggtcgg agttactaac tat

33

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 88
Ala Arg Asp Leu Met Val Gly Val Thr Asn Tyr
1 5 10

<210> 89
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 89

```

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtcg cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacactgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
tttcaccaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac 180
tctgggggtcc cagacagatt caccggcagt gggtcaggca ctgatttcac actaaaaatc 240
agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtc ttttactgca tgcaagggtc acactggcct 300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

```

<210> 90

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 90

```

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

```

<210> 91

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 91

```

caaagcctcg tatacactga tggaaacacc tac 33

```

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 92

```

Gln Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr

```

1	5	10
<210> 93		
<211> 9		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Tổng hợp		
<400> 93		
aaggtttct		9
<210> 94		
<211> 3		
<212> PRT		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Tổng hợp		
<400> 94		
Lys Val Ser		
1		
<210> 95		
<211> 30		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Tổng hợp		
<400> 95		
atgcaagggtt cacactggcc tccgtacact		30
<210> 96		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Tổng hợp		
<400> 96		
Met Gln Gly Ser His Trp Pro Pro Tyr Thr		
1 5 10		
<210> 97		
<211> 357		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Tổng hợp		

<400> 97

caggttcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc ctgcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg atccttcagt ggtaactact ggagctggat cgcgcagtcc 120
 ccagggaagg ggttggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaactc caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagg caccatatca ttagacacgt ccaagaacca gttatccctg 240
 aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gccatgtatt attgtgtgag aggggggtggg 300
 gactactact tcggcatgga cgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 98

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 98

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

<210> 99

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 99

ggtggatcct tcagtggtaa ctac

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 100

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asn Tyr

1

5

<210> 101
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 101
 atcaatcatc gtggaaactc c

21

<210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 102
 Ile Asn His Arg Gly Asn Ser
 1 5

<210> 103
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 103
 gtgagagggg gtggggacta ctacttcggc atggacgtc

39

<210> 104
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 104
 Val Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 105
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 105

```

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga aatgatttag gctggtatca gctgagacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct acatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt atccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa g                                     321

```

<210> 106

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 106

```

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

```

<210> 107

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 107

cagggcattg gaaatgat

18

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 108

```

Gln Gly Ile Gly Asn Asp
 1           5

```

<210> 109

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 109
 gctacatcc

9

<210> 110
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 110
 Ala Thr Ser
 1

<210> 111
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 111
 ctacaagatt acaattatcc gtggacg

27

<210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 112
 Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 113
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 113
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggagg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagtcc 120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagttgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtatatt tctgtgcgag aggggggtggg 300
 acctactact acggtatgga cgtttggggc caagggacca cggtcacctg ctcctca 357

<210> 114

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 114

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

<210> 115

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 115

ggagggtcct tcagtggtta ctac

24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 116

Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr	Tyr
1				5			

<210> 117

<211> 21

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 117
 atcaatcata gtggaagcac c

21

<210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 118
 Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 119
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 119
 gcgagagggg gtgggaccta ctactacggt atggacgtt

39

<210> 120
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 120
 Ala Arg Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 121
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 121
 gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga tatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120

```

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag gattacaatt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggatatcaa a                                           321

```

<210> 122
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 122
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Tyr Asp
          20           25           30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100          105

```

<210> 123
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 123
cagggcattg gatatgat                                           18

```

<210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 124
Gln Gly Ile Gly Tyr Asp
 1           5

```

<210> 125
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 125

gctgcatcc

9

<210> 126

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 126

Ala Ala Ser

1

<210> 127

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 127

ctacaggatt acaattaccc gtggacg

27

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 128

Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr

1

5

<210> 129

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 129

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg atccttcagt ggtgactact ggagctggat tcgccagtcc 120
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aaactgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggaggcggg 300

gactactact acggtatgga cgtctggggc ctagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

$\langle 210 \rangle$ 130

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Tổng hợp

$\langle 400 \rangle$ 130

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asp

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Leu Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 131

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Tổng hợp

<400> 131

ggtggatcct tcagtggtga ctac

24

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Tổng hợp

<400> 132

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asp Tyr

1 5

<210> 133

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 133

atcaatcata gtggaagcac c

21

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 134

Ile Asn His Ser Gly Ser Thr

1

5

<210> 135

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 135

gcgagaggag gcggggacta ctactacggt atggacgtc

39

<210> 136

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 136

Ala Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 137

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 137

gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct acatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt acccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 138
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 138
 Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 139
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 139
 cagggcattg gaaatgat

18

<210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 140
 Gln Gly Ile Gly Asn Asp
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 141
gctacatcc

9

<210> 142
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 142
Ala Thr Ser
1

<210> 143
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 143
ctacaagatt acaattaccc gtggacg

27

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 144
Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 145
<211> 3633
<212> ADN
<213> Người tinh khôn

<400> 145
atgcgaccct ccggggacggc cggggcagcg ctcttggcgc tgctggctgc gctctgcccg 60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgagggtg 180
gtccttggga atttggaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag 240
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgccctca acacagtgga gcgaattcct 300
ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccac gagaaattta 420
caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc 540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600

```

ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgcccga gcagtgtctcc 660
gggctgtgcc gtggcaagtc cccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc 720
acaggcccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780
aaggacacct gccccccact catgtcttac aaccaccacca cgtaccagat ggatgtgaac 840
cccaggggca aatacagctt tgggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960
gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata 1020
ggtattgggtg aatttaaaga ctcactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa 1080
aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgcccgg tggcatttag gggtgactcc 1140
ttcacacata ctctctctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200
atcacagggt ttttgtctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260
gagaacctag aaatcatatc cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgagtc 1320
gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380
gtgataaattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440
tttgggacct ccggtcagaa aacaaaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500
gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tccccgagg gctgtgtggg cccggagccc 1560
agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgaac 1620
cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca 1680
gagtgcctgc ctgagccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740
cagtgtgccc actacattga cggccccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg 1800
ggagaaaaaca acaccctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860
catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggctctg aaggctgtcc aacgaatggg 1920
cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtggggggccc tcctcttgct gctggtggtg 1980
gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgtgcgg 2040
aggctgtgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100
caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160
ggtgcgttcg gcacggtgta taagggactc tggatcccag aaggtagaaa agttaaatt 2220
cccgctcgcta tcaagggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgcct gctgggcatc 2340
tgcctcacct ccaccgtgca gctcatcacg cagctcatgc cttcggctg cctcctggac 2400
tatgtccggg aacacaaaaga caatattggc tcccagtagg tgctcaactg gtgtgtgcag 2460
atcgaaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcgcttgg tgcaccgca cctggcagcc 2520
aggaacgtac tggtagaaac accgcagcat gtcaagatca cagatttttg gctggccaaa 2580
ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640
atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
ggggtgactg tttgggagtt gatgacctt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760
agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctc ctcagccacc catatgtacc 2820
atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgccccaaag 2880
ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccag agccccagcg ctacctgtc 2940
attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaaact ctaccgtgcc 3000
ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catccacag 3060
cagggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtga 3120
accagcaaca attccaccgt ggcttgcatg gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc 3180
aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgctt gactgaggac 3240
agcatagacg acaccttctt cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg 3300
cccgtggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaacc cgcgcccagc 3360
agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccg gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggtctc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600
gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

```

<210> 146

<211> 1210

<212> PRT

<213> Người tinh khôn

<400> 146

```

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1          5          10          15
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20          25          30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35          40          45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50          55          60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65          70          75          80
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85          90          95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100          105          110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115          120          125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130          135          140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145          150          155          160
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165          170          175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180          185          190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195          200          205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210          215          220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225          230          235          240
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245          250          255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260          265          270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275          280          285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290          295          300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305          310          315          320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325          330          335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340          345          350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355          360          365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370          375          380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385          390          395          400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405          410          415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420          425          430

```

His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu		
		435					440					445					
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser		
	450					455					460						
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu		
465					470					475					480		
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu		
				485					490					495			
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro		
			500					505					510				
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn		
		515					520					525					
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly		
		530				535					540						
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro		
545					550					555					560		
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro		
				565					570					575			
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val		
			580					585					590				
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp		
		595					600					605					
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys		
	610				615					620							
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly		
625					630				635						640		
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu		
				645					650					655			
Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met	Arg	Arg	Arg	His		
			660					665					670				
Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Thr	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Arg	Glu	Leu		
		675					680					685					
Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	Asn	Gln	Ala	Leu	Leu		
	690					695					700						
Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ser		
705					710					715					720		
Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu		
				725					730					735			
Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser		
			740					745					750				
Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Ser		
		755					760						765				
Val	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser		
	770					775						780					
Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	Met	Pro	Phe	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp		
785					790					795					800		
Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asn		
				805					810					815			
Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Asn	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Arg		
			820					825					830				
Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Thr	Pro		
		835					840					845					
Gln	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Ala		
	850					855					860						
Glu	Glu	Lys	Glu	Tyr	His	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp		
865					870					875					880		

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895
 Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910
 Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925
 Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940
 Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960
 Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975
 Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990
 Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
 995 1000 1005
 Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe
 1010 1015 1020
 Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala
 1025 1030 1035 1040
 Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln
 1045 1050 1055
 Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp
 1060 1065 1070
 Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro
 1075 1080 1085
 Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser
 1090 1095 1100
 Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser
 1105 1110 1115 1120
 Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro
 1125 1130 1135
 Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp
 1140 1145 1150
 Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp
 1155 1160 1165
 Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn
 1170 1175 1180
 Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val
 1185 1190 1195 1200
 Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
 1205 1210

<210> 147

<211> 943

<212> PRT

<213> Người tinh khôn

<400> 147

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser
 35 40 45

Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	50	55	60
Pro	Cys	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	65	70	75
Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	85	90	95
Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	100	105	110
Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	115	120	125
Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	130	135	140
Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	145	150	155
Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	165	170	175
Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	180	185	190
Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	195	200	205
Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	210	215	220
Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	225	230	235
Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	245	250	255
Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	260	265	270
Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	275	280	285
Ile	Gln	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	290	295	300
Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	305	310	315
Gly	Pro	His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	325	330	335
Asn	Thr	Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	340	345	350
Cys	His	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	355	360	365
Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	370	375	380
Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	385	390	395
Met	Arg	Arg	Arg	His	Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Thr	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	405	410	415
Gln	Glu	Arg	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	420	425	430
Asn	Gln	Ala	Leu	Leu	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile	435	440	445
Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Trp	450	455	460
Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	465	470	475
Arg	Glu	Ala	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	485	490	495

```

Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly
      500                      505                      510
Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe
      515                      520                      525
Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser
      530                      535                      540
Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr
545      550                      555                      560
Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
      565                      570                      575
Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala
      580                      585                      590
Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys
      595                      600                      605
Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr
      610                      615                      620
Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu
625      630                      635                      640
Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile
      645                      650                      655
Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys
      660                      665                      670
Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala
      675                      680                      685
Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met
      690                      695                      700
Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met
705      710                      715                      720
His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp
      725                      730                      735
Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro
      740                      745                      750
Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu
      755                      760                      765
Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp
      770                      775                      780
Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln
785      790                      795                      800
Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
      805                      810                      815
Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys
      820                      825                      830
Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu
      835                      840                      845
Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr
      850                      855                      860
Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val
865      870                      875                      880
Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His
      885                      890                      895
Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys
      900                      905                      910
Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala
      915                      920                      925
Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
      930                      935                      940

```

<210> 148
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 148
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 1 5 10

<210> 149
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 149
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Lys

<210> 150
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 150
 Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr
 1 5 10 15
 Asp His

<210> 151
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 151
 Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Ser Lys
 20

<210> 152
 <211> 408
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 152

```

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1      5      10      15
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
20     25     30
Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser
35     40     45
Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly
50     55     60
Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp
65     70     75     80
Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr
85     90     95
Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
100    105    110
Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
115    120    125
Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
130    135    140
Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
145    150    155    160
Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
165    170    175
Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
180    185    190
Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
195    200    205
Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
210    215    220
Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
225    230    235    240
Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys
245    250    255
Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys
260    265    270
Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys
275    280    285
Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
290    295    300
Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
305    310    315    320
Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
325    330    335
Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
340    345    350
Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
355    360    365
Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Glu Gln Lys Leu
370    375    380
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
385    390    395    400
Asp Leu His His His His His His

```

405

<210> 153
 <211> 613
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 153

Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala		
1				5				10						15			
Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Gly	Asn	Tyr		
			20					25					30				
Val	Val	Thr	Asp	His	Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser		
		35					40					45					
Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly		
	50					55					60						
Pro	Cys	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp		
65					70				75						80		
Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr		
			85					90						95			
Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp		
			100					105						110			
Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu		
		115					120						125				
Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro		
	130					135					140						
Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg		
145					150					155					160		
Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu		
				165					170					175			
Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly		
		180						185						190			
Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile		
	195						200					205					
Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile		
	210					215						220					
Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His		
225					230				235						240		
Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys		
				245					250					255			
Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys		
			260					265						270			
Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys		
	275						280					285					
Ile	Gln	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys		
	290					295						300					
Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp		
305					310					315					320		
Gly	Pro	His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn		
				325					330					335			
Asn	Thr	Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu		
			340					345					350				
Cys	His	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly		
		355					360						365				

Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Glu Pro Arg Gly
 370 375 380
 Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
 385 390 395 400
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val
 405 410 415
 Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 420 425 430
 Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
 435 440 445
 Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
 450 455 460
 Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
 465 470 475 480
 Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala
 485 490 495
 Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro
 500 505 510
 Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln
 515 520 525
 Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr
 530 535 540
 Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
 545 550 555 560
 Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
 565 570 575
 Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser
 580 585 590
 Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser
 595 600 605
 Arg Thr Pro Gly Lys
 610

<210> 154

<211> 684

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 154

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

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125
 Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140
 His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160
 Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175
 Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190
 Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205
 Lys Leu Thr Lys Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
 210 215 220
 Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255
 Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335
 Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350
 Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365
 Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
 370 375 380
 Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
 385 390 395 400
 Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
 405 410 415
 Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540
 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560

Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	
				565				570				575				
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val	
				580				585				590				
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp	
				595				600				605				
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys	
				610				615				620				
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	
625					630				635				640			
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Cys	Pro	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	
				645				650				655				
Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	
				660				665				670				
Leu	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly					
				675				680								

<210> 155

<211> 880

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Tổng hợp

<400> 155

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

Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg	Asp			
				245					250					255				
Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn	Pro			
			260					265						270				
Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gly			
		275					280					285						
Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp	His			
	290					295					300							
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu			
305					310					315					320			
Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val			
				325					330					335				
Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn			
			340					345						350				
Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp			
		355					360					365						
Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr			
	370					375					380							
Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu			
385					390					395					400			
Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp			
				405					410					415				
Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln			
		420					425						430					
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu			
		435					440				445							
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser			
	450					455					460							
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu			
465					470					475					480			
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu			
				485					490					495				
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro			
			500					505					510					
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn			
		515					520					525						
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly			
	530					535					540							
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro			
545					550					555					560			
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro			
				565					570					575				
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val			
			580					585					590					
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp			
		595					600					605						
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys			
	610					615					620							
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly			
625					630					635					640			
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro			
				645					650					655				
Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser			
			660				665					670						
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu			
		675					680					685						

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 690 695 700
 Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 705 710 715 720
 Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 725 730 735
 Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 740 745 750
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 755 760 765
 Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 770 775 780
 Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
 785 790 795 800
 Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
 805 810 815
 Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
 820 825 830
 Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
 835 840 845
 Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
 850 855 860
 Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 865 870 875 880

<210> 156

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 156

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> 157

<211> 327

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 157

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

```

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210                      215                      220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                      230                      235                      240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                      245                      250                      255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                      260                      265                      270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                      275                      280                      285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
                      290                      295                      300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                      310                      315                      320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                      325

```

<210> 158

<211> 327

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 158

```

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

```

225		230		235		240									
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				245					250					255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			260					265					270		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		275					280					285			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290					295					300				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305					310				315					320	
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
				325											

<210> 159
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ala

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Arg hoặc Lys

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = Gly hoặc Asp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Asp, Gly, Ile hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Tyr, Leu, His hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Val, Glu, Asp, Met hoặc vắng mặt

<220>

<221> BIẾN THỂ
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Trp, Ile, Tyr, Val hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Gly hoặc Arg

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Thr, Asp, Lys, Gly hoặc Val

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = His, Asp, Thr hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Tyr hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Tyr hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Tyr hoặc Asn

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Arg hoặc Tyr

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Pro, Tyr hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Leu, Gly hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (17)...(17)
 <223> Xaa = Phe, Met hoặc vắng mặt

<220>

<221> BIẾN THỂ
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Asp hoặc văng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Tyr, Val hoặc văng mặt

<400> 159
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa

<210> 160
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Gln, Leu hoặc Met

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Gln

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = Leu, Tyr, Asp hoặc Gly

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Asn, Asp, Tyr hoặc Ser

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Ser, Arg, Asn hoặc His

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Tyr, Ser hoặc Trp

<220>
 <221> BIẾN THỂ

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Pro hoặc Ser

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Pro hoặc vắng mặt

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Leu, Arg, Ile, Trp hoặc Tyr

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = Thr

<400> 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

<210> 161

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Phe hoặc Gly

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Pro, Thr hoặc Ser

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Phe

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ser hoặc Asp

<220>

<221> BIẾN THỂ
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Ser, Arg, Asp, Gly hoặc Ala

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Tyr hoặc Asp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Asp, Gly, Ala hoặc Tyr

<400> 161
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 162
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ile

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Gly, Trp, Ser hoặc Asn

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = His, Trp, Tyr hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Thr, Asp, Asn hoặc His

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Ala, Gly hoặc Ser

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (6)...(6)

<223> Xaa = Gly hoặc Ser

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Ala, Asn hoặc Ser

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Thr, Lys hoặc Ile

<400> 162

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 163

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Gly hoặc Ser

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ile, Thr, Val hoặc Leu

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Asn, Ser, Gly hoặc Val

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Asn, Ser hoặc Tyr

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Thr hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Asp hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Gly hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Asn hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Thr hoặc vắng mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Tyr, Trp hoặc Asp

<400> 163
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 164
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ala, Lys hoặc Gly

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Ala, Thr hoặc Val

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = Ser

<400> 164
 Xaa Xaa Xaa
 1

<210> 165

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 165

Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys
1				5				10						15	

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFRvIII người, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó chứa tổ hợp của các trình tự axit amin HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48.

2. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó có hằng số cân bằng phân ly (K_D) đối với dime EGFRvIII người là khoảng 50nM hoặc ít hơn, khoảng 20 nM hoặc ít hơn, khoảng 10 nM hoặc ít hơn, khoảng 5,0 nM hoặc ít hơn, khoảng 1,0 nM hoặc ít hơn, hoặc khoảng 0,5 nM hoặc ít hơn, khi được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

3. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được liên hợp với chất gây độc tế bào, tùy ý trong đó chất gây độc tế bào được chọn từ nhóm chỉ bao gồm (i) các chất độc sinh học, chất hóa trị và đồng vị phóng xạ hoặc (ii) maytansinoid, auristatin, tomaymycin, duocarmycin, ^{225}Ac , ^{227}Th , và các dẫn xuất bất kỳ của chúng.

4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó có hằng số K_D đối với dime EGFR người lớn hơn hằng số K_D đối với dime EGFRvIII ít nhất khoảng 4 lần, ít nhất khoảng 10 lần, ít nhất khoảng 50 lần, ít nhất khoảng 100 lần, ít nhất khoảng 500 lần, ít nhất khoảng 1000 lần, ít nhất khoảng 2000 lần, hoặc ít nhất khoảng 3000 lần, khi đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt, tùy ý trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó không liên kết với dime EGFR ở mức có thể phát hiện được bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

5. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó:

(a) HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 34; hoặc

(b) LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 42.

6. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa cặp trình tự HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID No: 34/42.

7. Dược phẩm có chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, chất mang dược dụng, và tùy ý một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung được chọn từ nhóm chỉ bao gồm chất hóa trị, chất chống viêm, và chất giảm đau.

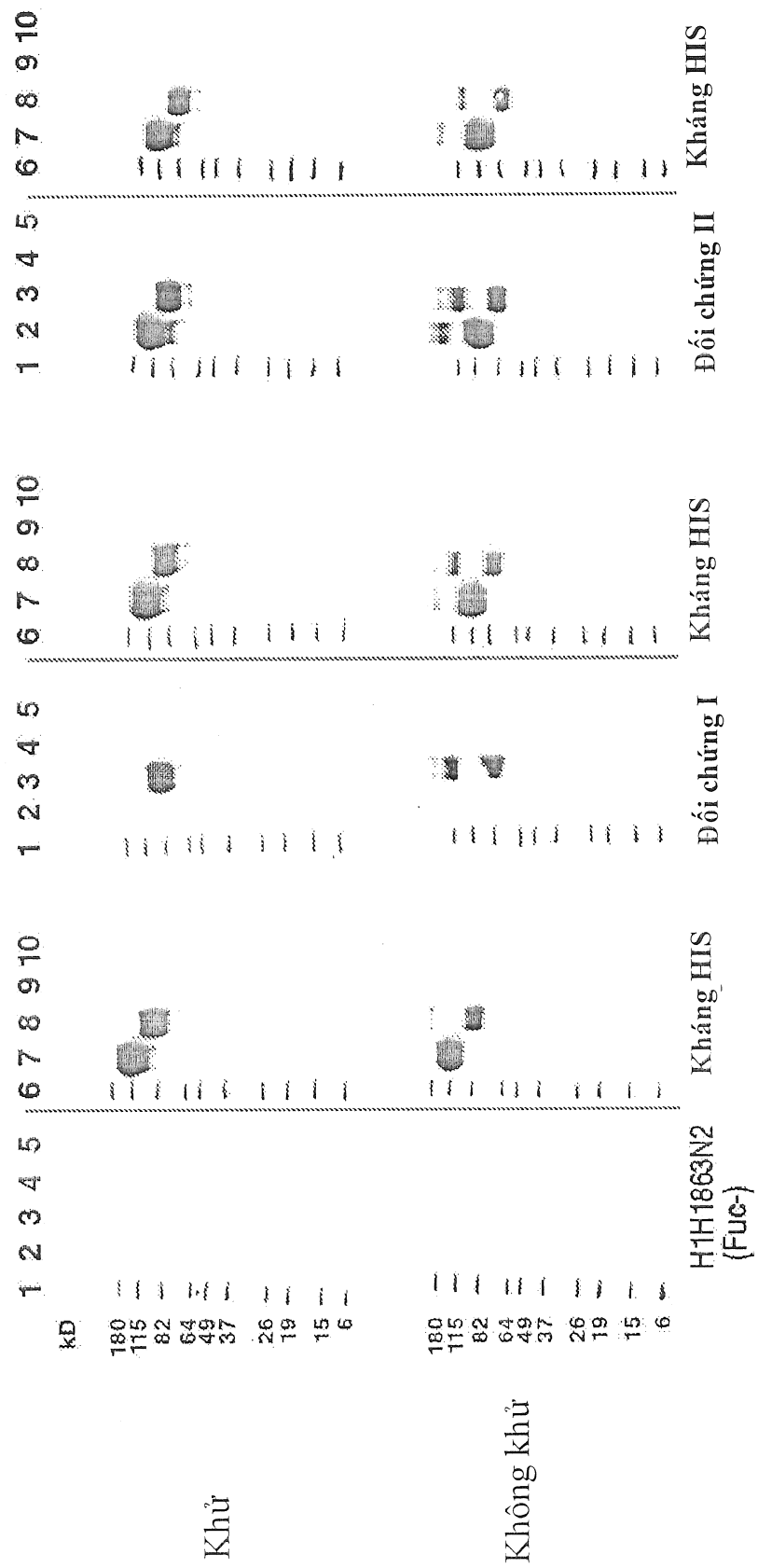


Fig. 1A

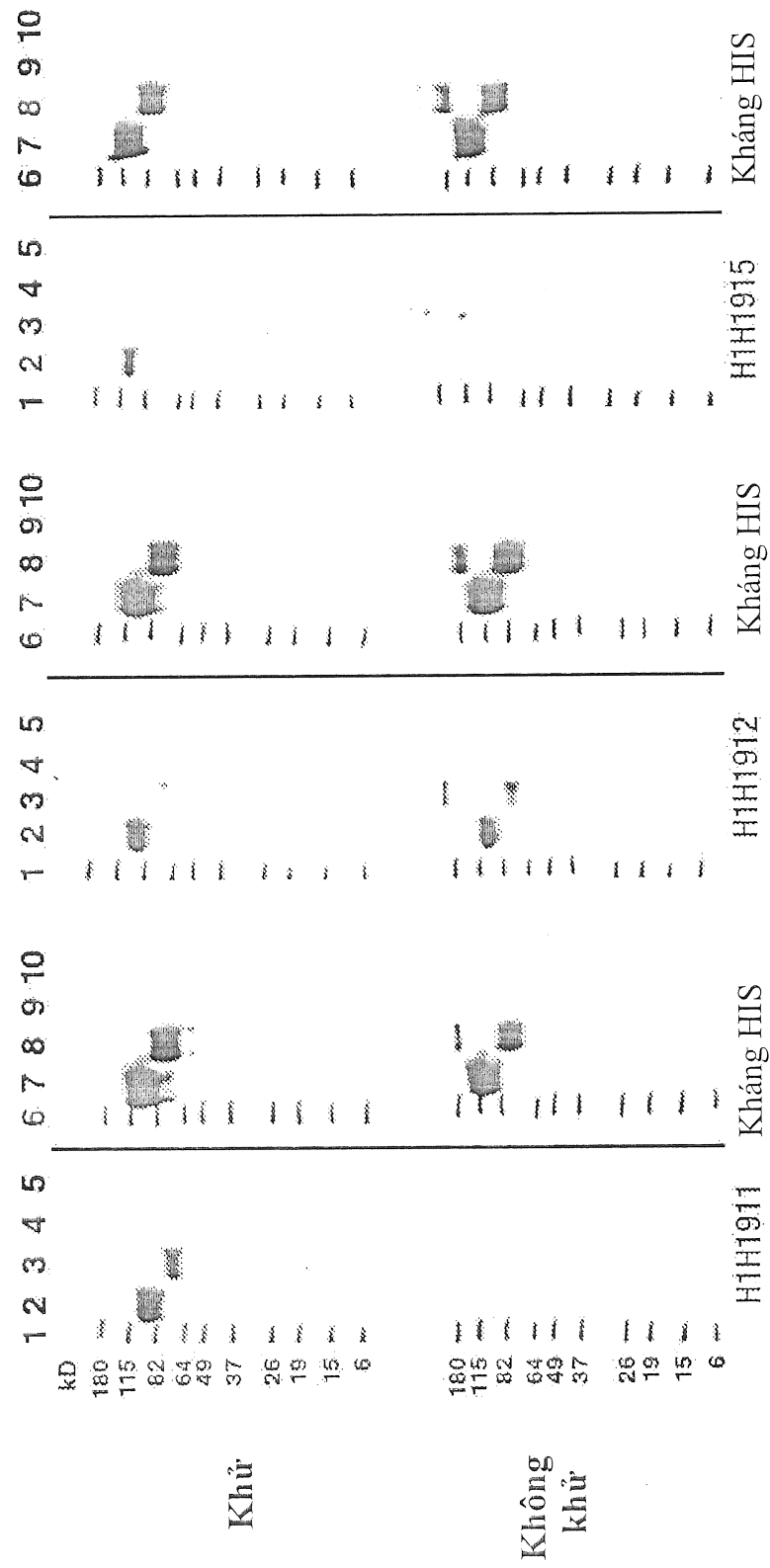


Fig. 1B

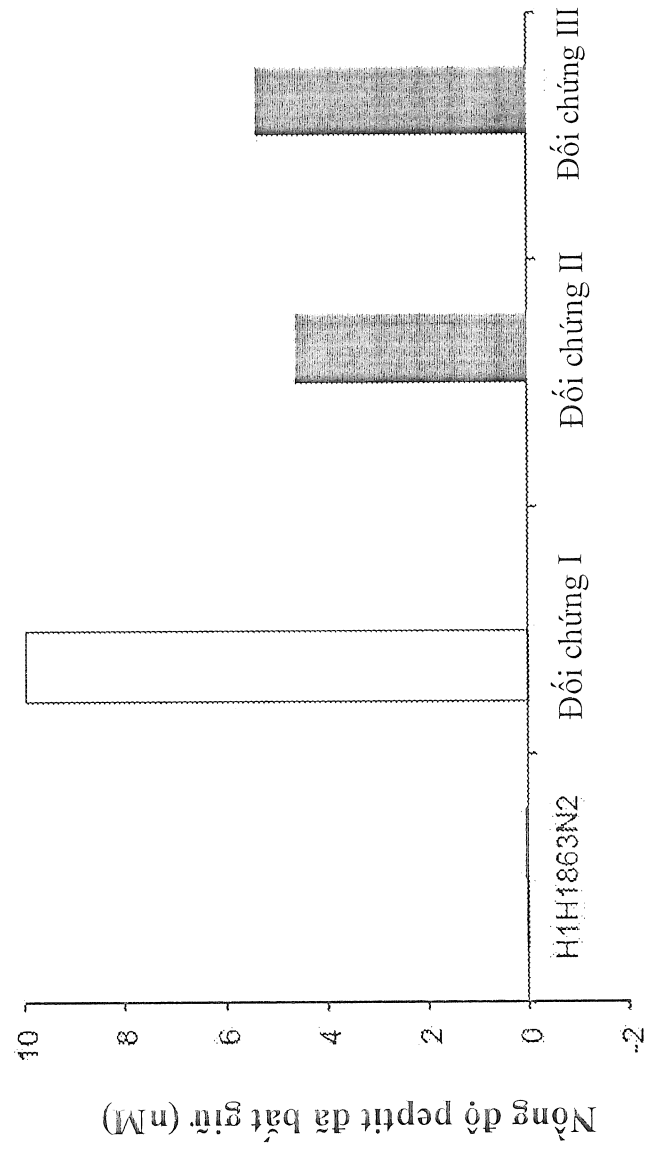


Fig. 2

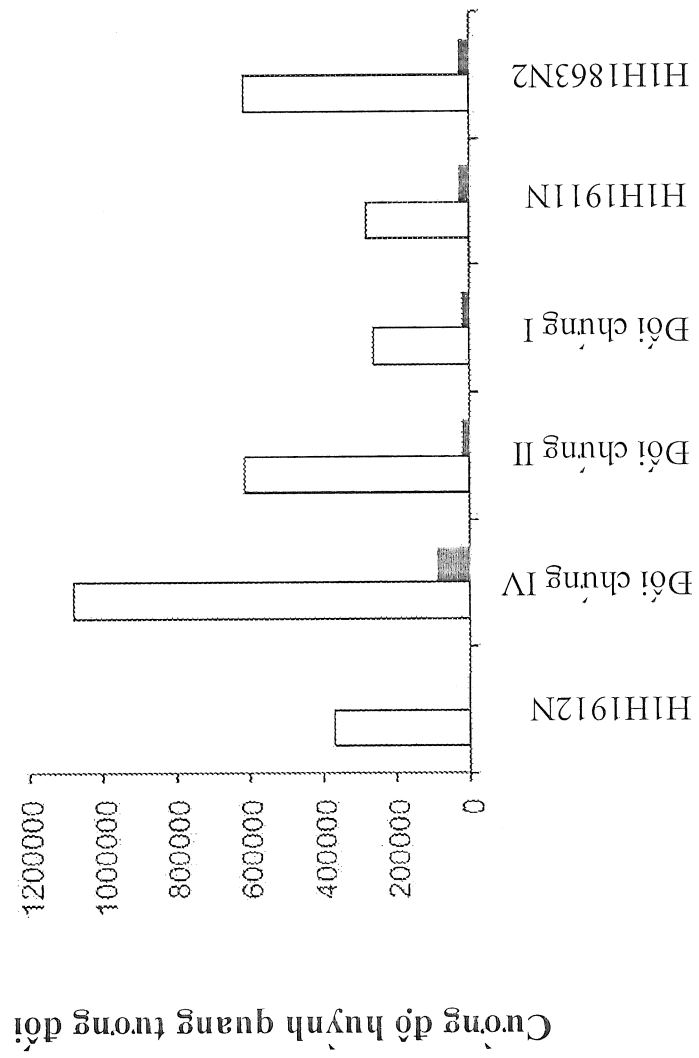


Fig. 3

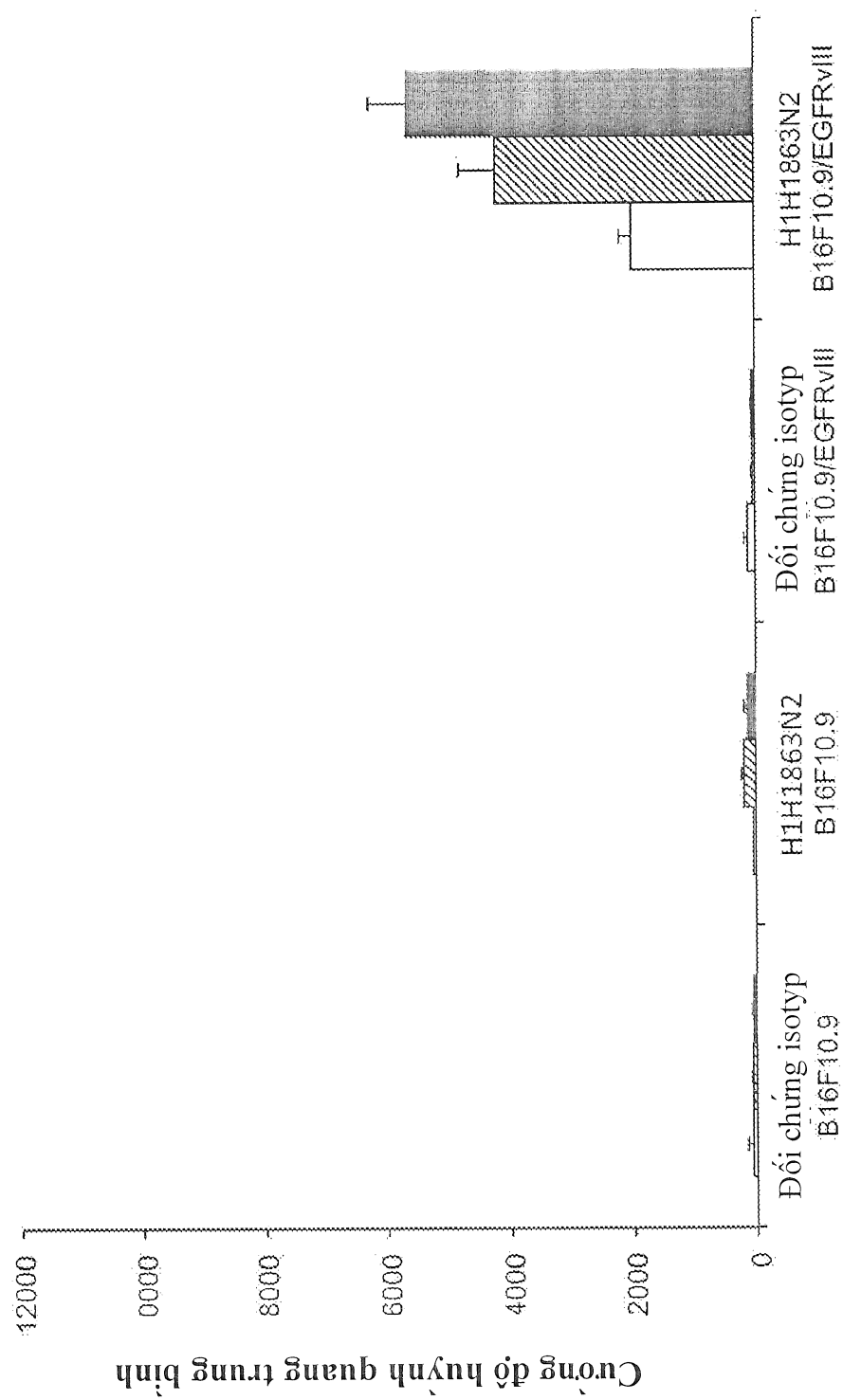


Fig. 4A

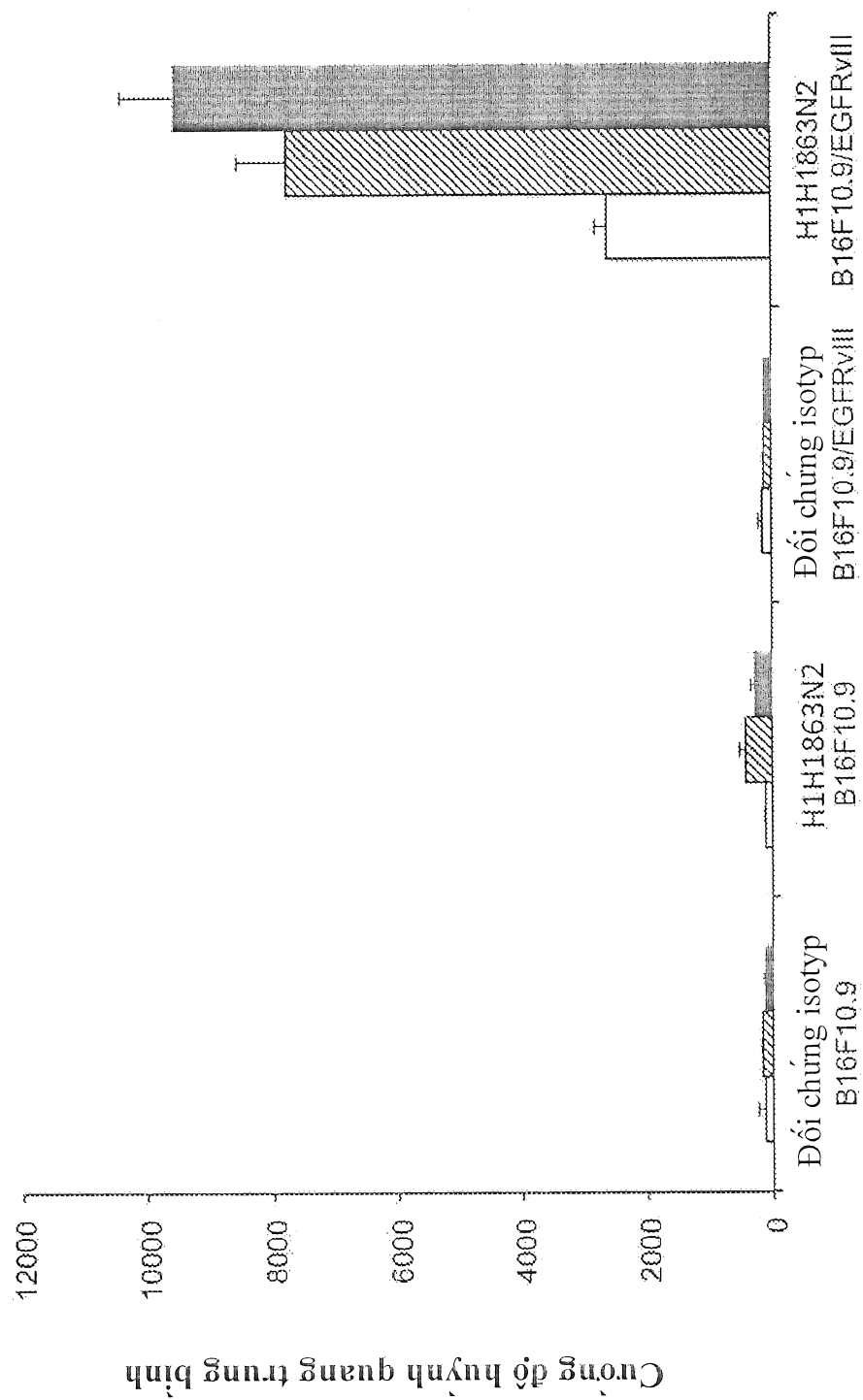


Fig. 4B

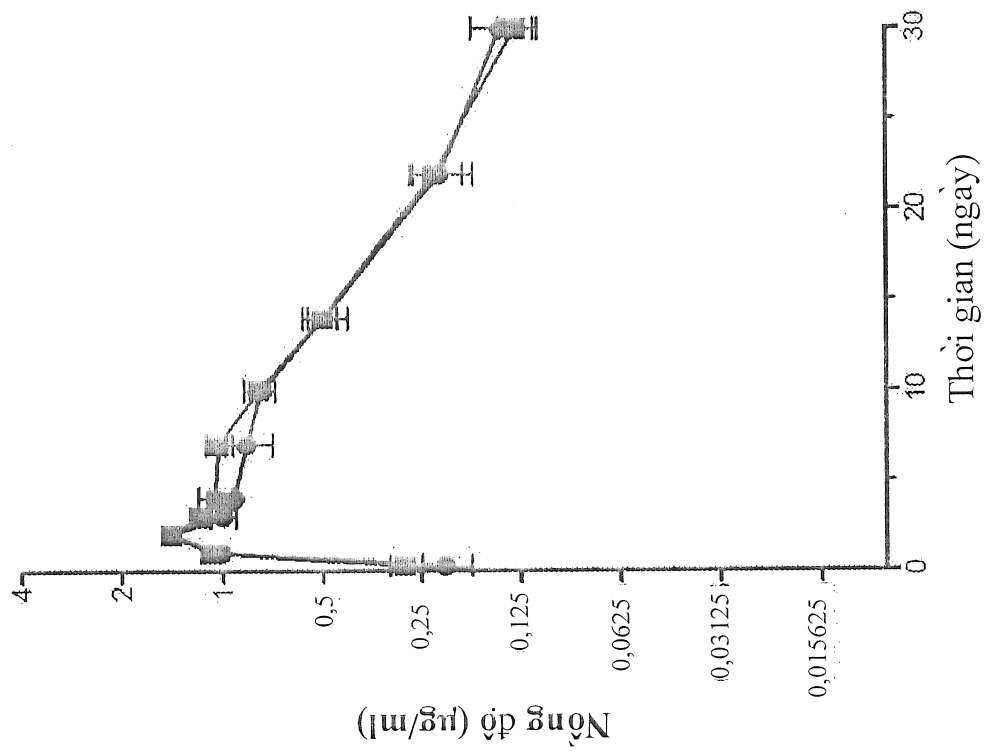


Fig. 5B

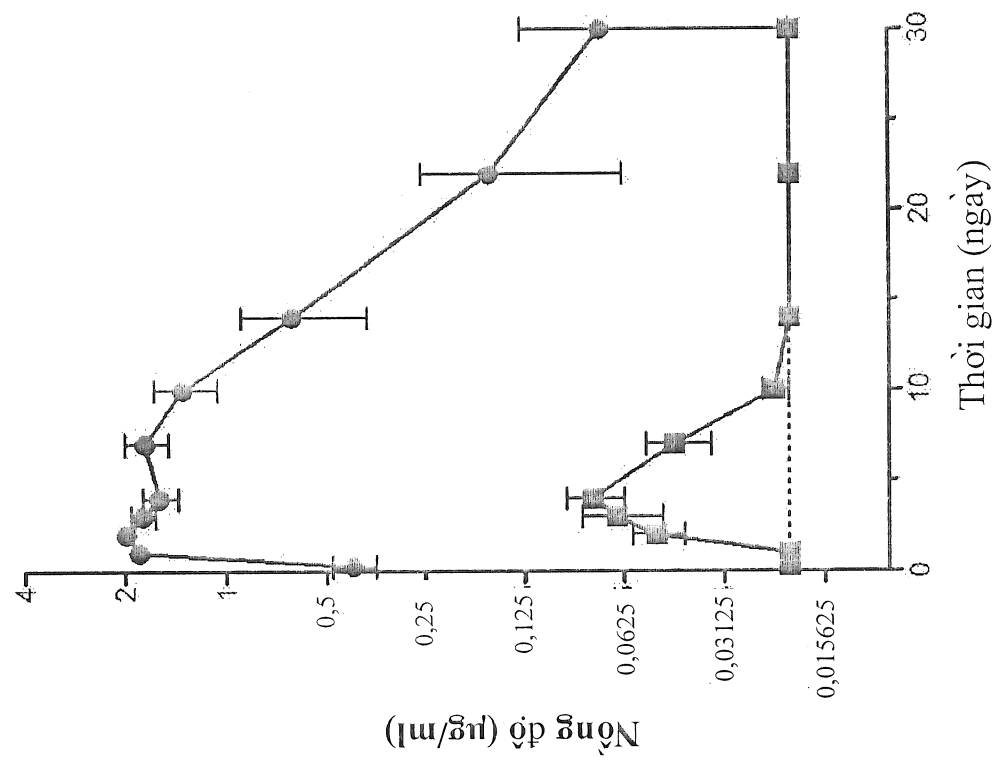


Fig. 5A

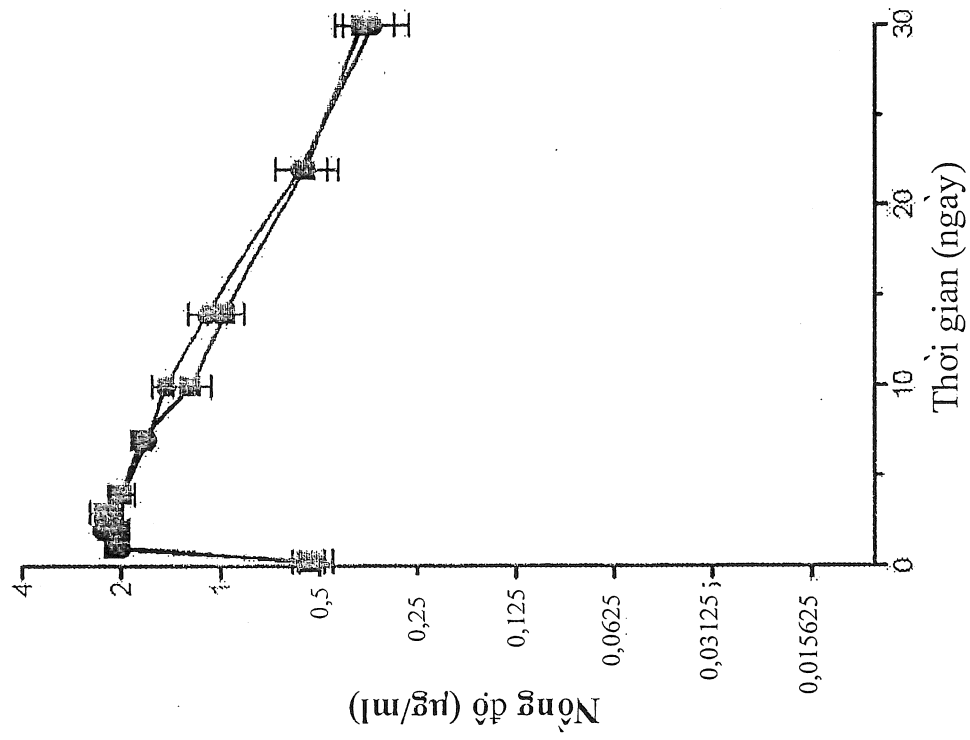


Fig. 5D

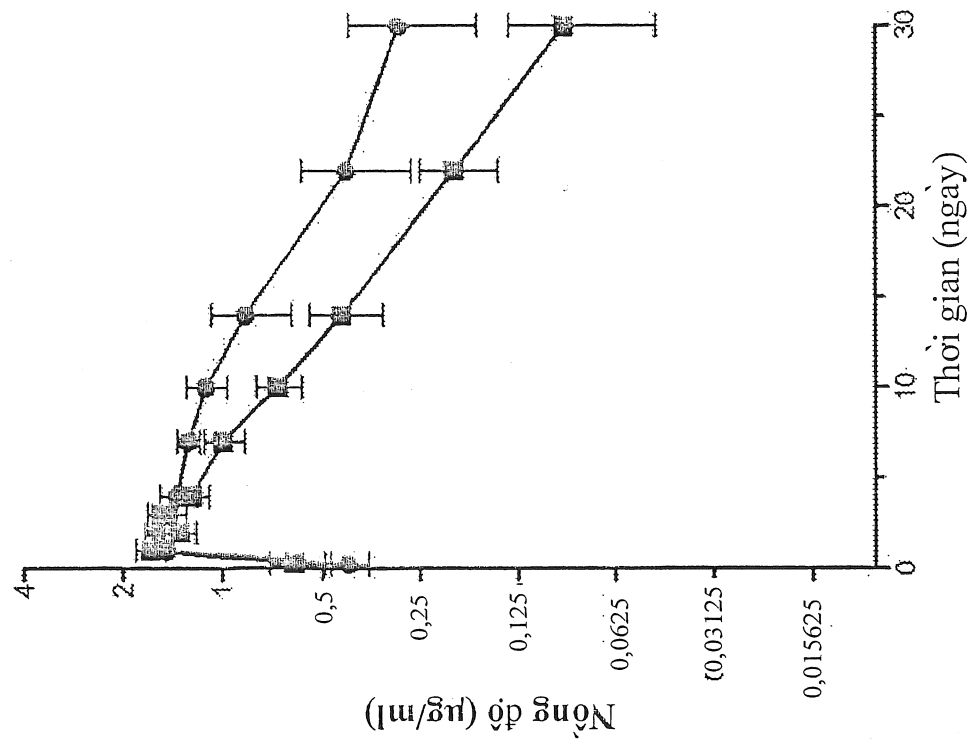


Fig. 5C