



(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)



1-0033980

(51)¹⁹ C12N 15/09; C12P 21/08; A61K 45/00; (13) B
A61P 1/04; A61P 17/00; A61P 17/06;
A61P 19/02; A61P 21/00; A61P 21/04;
A61P 25/00; A61P 27/02; A61P 29/00;
A61P 3/10; A61P 31/00; A61P 35/00;
A61P 37/02; A61P 37/06; A61P 37/08;
A61P 43/00; A61P 5/16; A61P 7/04;
A61P 7/06; C07K 16/28; C07K 16/46;
C12N 1/15; C12N 1/19; C12N 1/21;
C12N 5/10; A61K 31/56; A61K 39/395

(21) 1-2019-01450

(22) 07/09/2017

(86) PCT/JP2017/032212 07/09/2017

(87) WO 2018/047894 A1 15/03/2018

(30) 2016-175491 08/09/2016 JP

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/07/2019 376A

(73) Daiichi Sankyo Company, Limited (JP)

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

(72) MUKASA, Ryuta (JP); NAKAMURA, Kensuke (JP); MURAMATSU, Sumie (JP);
MAKITA, Naoyuki (JP).

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

(54) KHÁNG THỂ ĐỀ ĐIỀU TRỊ BỆNH TỰ MIỄN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết của nó mà liên kết với vùng 3 của LAG-3 ở người và có một hoặc nhiều các đặc tính được mô tả trong mục (ii) đến (v), và các đặc tính được mô tả trong mục (i) và (vi) sau đây: (i) có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) in vitro; (ii) giảm số lượng tế bào dương tính với LAG-3 in vivo ở dạng fucoza thấp; (iii) ngăn ngừa viêm não tủy tự miễn thử nghiệm in vivo ở dạng fucoza thấp; (iv) liên kết với tế bào T được hoạt hóa ở người; (v) LAG-3 ở người liên kết với phân tử phức hợp tương thích mô chính nhóm II ở người với sự có mặt của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó; và (vi) sự có mặt của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó cho phép LAG-3 ở người tạo ra chức năng ức chế tế bào T ở người. Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể, mảnh liên kết của nó, phân tử chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó, polynucleotit, vector, tế bào, phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó, kháng thể hoặc mảnh liên kết thu được bằng phương pháp sản xuất này, chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó, được phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó, được phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh liên quan đến tế bào dương tính với LAG-3 như các bệnh tự miễn, việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh này, và phương pháp điều trị các bệnh này, phương pháp bao gồm bước sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào lympho T (tế bào T) làm tế bào mà đóng vai trò trung tâm trong đáp ứng miễn dịch, và do đó tế bào T có các đặc hiệu kháng nguyên khác nhau, mà được cho là có từ 10 triệu đến 10 tỷ dòng vô tính, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó mặt trong cơ thể, để xử lý các kháng nguyên khác nhau. Khi kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể, chỉ một lượng rất hạn chế của các dòng vô tính đặc hiệu đối với kháng nguyên trong số các tế bào T này được tăng sinh và được hoạt hóa để ảnh hưởng đến sức đề kháng của cơ thể thông qua quá trình sản xuất xytokin và hoạt tính gây độc tế bào, v.v. Trong các bệnh tự miễn, các tình trạng bệnh lý khác nhau được cho là được khởi phát bởi đáp ứng miễn dịch bất thường đối với chính một số kháng nguyên. Thậm chí trong các trường hợp này, hầu hết các dòng vô tính khác mà không có kháng nguyên đặc hiệu này không được tăng sinh và được hoạt hóa và thay vào đó được duy trì trong trạng thái nghỉ. Do đó, việc loại bỏ một cách chọn lọc chỉ tế bào T được hoạt hóa có thể ngăn ngừa tính miễn dịch một cách đặc hiệu, mà không ảnh hưởng đến hầu hết các tế bào T có đặc hiệu kháng nguyên khác và do đó có thể là phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa hữu hiệu chống lại các bệnh tự miễn, sự thải ghép, các bệnh dị ứng, v.v. Trong khi đó, trong trường hợp trong đó tế bào T mà điều hòa âm tính hệ miễn dịch, như tế bào T điều hòa, chủ yếu được hoạt hóa, việc loại bỏ tế bào này có thể là

phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa hữu hiệu chống lại u ác tính, nhiễm trùng mạn tính, v.v.

LAG-3 (CD223) là phân tử xuyên màng đơn mà thuộc về siêu họ globulin miễn dịch (immunoglobulin) và được xác định là được biểu hiện một cách chọn lọc trong tế bào T được hoạt hóa (Tài liệu phi sáng chế 1). Đã có báo cáo cho rằng, khi huyết thanh miễn dịch ở thỏ có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxic - CDC) chống lại phân tử LAG-3 của chuột được sử dụng cho mẫu dị ghép tim ở chuột, tế bào dương tính với LAG-3 trong giảm ghép, để kéo dài thời gian đối với sự thải ghép (Tài liệu phi sáng chế 2). Cũng có báo cáo cho rằng kháng thể kháng LAG-3 ở người A9H12 có hoạt tính chéo với khi đầu chó và có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) ngăn ngừa phản ứng tăng miễn cảm loại trì hoãn của khi đầu chó, mặc dù đáp ứng liều của nó là chưa rõ ràng (Tài liệu phi sáng chế 3), và kháng thể được nhân hóa của nó được tạo ra (Tài liệu sáng chế 2).

LAG-3 được xác định là liên kết với phân tử phức hợp tương thích mô chính (hoặc, phức hợp gen tương thích mô chính) (major histocompatibility complex - MHC) nhóm II, nhờ đó chuyển một số tín hiệu ức chế đến tế bào T để điều hòa chức năng tế bào T âm tính (Tài liệu phi sáng chế 1). Đối với liên kết của LAG-3 với phân tử MHC nhóm II, vùng đầu cuối N 1 và 2 của bốn vùng ngoại bào giống globulin miễn dịch của LAG-3 được xem là quan trọng (Tài liệu phi sáng chế 4), và cũng có báo cáo cho rằng sự ức chế chức năng tế bào T này thông qua LAG-3 được chứng minh là hiệu quả với tín hiệu khác mà ức chế chức năng tế bào T thông qua PD-1 phân tử, v.v. (Tài liệu phi sáng chế 5). Trên thực tế, phương pháp điều trị ung thư mới để hoạt hóa chức năng tế bào miễn dịch bằng cách ức chế chức năng ức chế tế bào T của LAG-3 để tấn công tế bào ung thư đã được phát triển sâu rộng trong những năm gần đây (Tài liệu phi sáng chế 6 và 7). Do đó, trong case của applying LAG-3 kháng thể mà thiếu hụt tế bào dương tính với LAG-3 bởi hoạt tính ADCC, v.v., đối với các bệnh tự miễn, kháng thể không có hoạt tính ức chế chức năng ức chế tế bào T trong LAG-3 được cho là mong muốn hơn, vì không có nguy cơ các bệnh tự miễn trở lên trầm trọng hơn do sự hoạt hóa bất thường của hệ miễn dịch. Trong cả huyết thanh miễn dịch ở thỏ kháng LAG-3

ở chuột có hoạt tính CDC và kháng thể khảm kháng LAG-3 ở người A9H12 có hoạt tính ADCC (IMP731: Tài liệu sáng chế 1 và 2) được mô tả trên đây, tế bào dương tính với LAG-3 không bị thiếu hụt một cách hoàn toàn (Tài liệu phi sáng chế 2 và 3), và do đó có thể xảy ra phản ứng phụ do phản ứng bất thường của tế bào T còn lại mà có không bị thiếu hụt và ảnh hưởng bất lợi đối với sự ức chế các bệnh tự miễn.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: US 2011/0070238 A1

Tài liệu sáng chế 2: WO 2014/140180

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Triebel, F., LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination., Trends Immunol., Dec. 2003; Vol. 24 (No. 12): p. 619-22

Tài liệu phi sáng chế 2: Haudebourg, T. et al., Depletion of LAG-3 positive cells in cardiac allograft reveals their role in rejection and tolerance., Transplantation, Dec. 2007; Vol. 84 (No. 11): p. 1500-06

Tài liệu phi sáng chế 3: Poirier, N. et al., Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3 (+))-activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates, Clin. Exp. Immunol., May 2011; Vol. 164 (No. 2): p. 265-74

Tài liệu phi sáng chế 4: Huard, B. et al., Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., May 27, 1997; Vol. 94 (No. 11): p. 5744-49

Tài liệu phi sáng chế 5: Okazaki, T. et al., PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice, J. Exp. Med., Feb. 7, 2011; Vol. 208 (No. 2): p. 395-407

Tài liệu phi sáng chế 6: Nguyen, L.T. and Ohashi, P.S., Clinical blockade of PD1 and LAG3-potential mechanisms of action, Nat. Rev. Immunol., Jan. 2015; Vol. 15 (No. 1): p. 45-56

Tài liệu phi sáng chế 7: Turnis, M.E. et al., Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy, Eur. J. Immunol. Jul. 2015; Vol. 45 (No. 7): p. 1892-905

Tài liệu phi sáng chế 8: Huard, B. et al., T cell major histocompatibility complex class II molecules down-regulate CD4+ T cell clone responses following LAG-3 binding, Eur. J. Immunol., May 1996; Vol. 26 (No. 5): p. 1180-06

Tài liệu phi sáng chế 9: Macon-Lemaitre, L and Triebel, F, The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells, Immunology, Jun. 2005; Vol. 115 (No. 2): p. 170-08

Tài liệu phi sáng chế 10: Li, M. et al., Reconstitution of human Fc gamma RIII cell type specificity in transgenic mice, J. Exp. Med., May 1, 1996; Vol. 183 (No. 3): p. 1259-63

Tài liệu phi sáng chế 11: Miller, Stephen D. et al., Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse, Current Protocols in Immunology, UNIT 15.1, Wiley, 2010: p. 15.1.1-15.1.20

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng LAG-3, v.v., trong đó các đặc tính khác nhau được cải thiện hoặc các nguy cơ được loại trừ hoặc được làm giảm so với kháng thể kháng LAG-3 đã biết.

Cách thức giải quyết vấn đề

Sáng chế đề xuất:

(1) Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết của nó mà liên kết với vùng 3 của LAG-3 ở người và có một hoặc nhiều các đặc tính được mô tả trong (ii) đến (v), và các đặc tính được mô tả trong (i) và (vi) sau đây:

- (i) có hoạt tính ADCC in vitro;
- (ii) giảm số lượng tế bào dương tính với LAG-3 in vivo ở dạng fucoza thấp;
- (iii) ngăn ngừa viêm não tủy tự miễn thử nghiệm in vivo ở dạng fucoza thấp;
- (iv) liên kết với tế bào T được hoạt hóa ở người;

(v) LAG-3 ở người liên kết với phân tử phức hợp tương thích mô chính nhóm II ở người với sự có mặt của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó; và

- (vi) sự có mặt của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó cho phép LAG-3 ở người tạo ra chức năng ức chế tế bào T ở người;
- (2) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (1), mà có các đặc tính được mô tả trong (ii) và/hoặc (iii),
- (3) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (1) hoặc (2), mà có tất cả các đặc tính được mô tả trong (ii) đến (v);
- (4) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), mà là kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa, hoặc kháng thể người;
- (5) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), mà chứa chuỗi nhẹ chứa CDRL1 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 50 hoặc Fig. 65, CDRL2 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 51 hoặc Fig. 66, và CDRL3 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 52 hoặc Fig. 67, và chuỗi nặng chứa CDRH1 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 47 hoặc Fig. 62, CDRH2 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 48 hoặc Fig. 63, và CDRH3 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 49 hoặc Fig. 64;
- (6) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (4) hoặc (5), mà là kháng thể được nhân hóa;
- (7) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (6), mà chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được tạo ra từ trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 28 hoặc Fig. 43 với axit amin tương ứng với vị trí 68 là Gly hoặc được thế bằng Ala, và axit amin tương ứng với vị trí 103 là Asn hoặc được thế bằng Asp, và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được tạo ra từ trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47 với axit amin tương ứng với vị trí 21 là Asp hoặc được thế bằng Asn, axit amin tương ứng với vị trí 31 là Leu hoặc được thế bằng Met, axit amin tương ứng với vị trí 33 là Ala hoặc được thế bằng Ile, axit amin tương ứng với vị trí 41 là Ile hoặc được thế bằng Met, axit amin tương ứng với vị trí 58 là Gln hoặc được thế bằng Lys, axit amin tương ứng với vị trí 63 là Ala hoặc được thế bằng Ser, axit amin tương ứng với vị trí 80 là Ser hoặc được thế bằng Asp, axit amin tương ứng với vị trí 85 là Ser hoặc được thế bằng Gly, axit amin tương ứng với vị trí 87 là Ser hoặc được thế bằng Tyr, axit

amin tương ứng với vị trí 98 là Leu hoặc được thế bằng Val, axit amin tương ứng với vị trí 103 là Phe hoặc được thế bằng Ala, axit amin tương ứng với vị trí 105 là Thr hoặc được thế bằng Phe, axit amin tương ứng với vị trí 124 là Val hoặc được thế bằng Leu, và axit amin tương ứng với vị trí 126 là Ile hoặc được thế bằng Leu;

(8) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (6) hoặc (7), mà chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa axit amin 21 đến axit amin 129 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 32, 34, 36, 38, và 40, và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng chứa axit amin 20 đến axit amin 140 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 28 và 30;

(9) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (6) đến (8), mà chứa trình tự axit amin chuỗi nhẹ chứa axit amin 21 đến axit amin 234 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 32, 34, 36, 38, và 40, và trình tự axit amin chuỗi nặng chứa axit amin 20 đến axit amin 470 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 28 và 30;

(10) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (6) đến (9), mà được chọn từ nhóm gồm có [i] đến [x] sau đây:

[i] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 34 (Fig. 49);

[ii] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 32 (Fig. 47);

[iii] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 36 (Fig. 51);

[iv] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) và chuỗi nhẹ có

trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 34 (Fig. 49);

[v] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 36 (Fig. 51);

[vi] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 38 (Fig. 53);

[vii] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 40 (Fig. 55);

[viii] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 32 (Fig. 47);

[ix] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 38 (Fig. 53); và

[x] kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 40 (Fig. 55);

(11) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (1), mà chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có độ tương đồng 95% hoặc cao hơn tương ứng với trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (10);

(12) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (1), mà chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bằng trình tự nucleotit của phân tử axit nucleic thứ hai mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic thứ nhất có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (10) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ cho nó, và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bằng trình tự nucleotit của phân tử axit nucleic thứ tư mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với phân tử axit nucleic thứ ba có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (10) hoặc trình tự nucleotit bổ trợ cho nó;

(13) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (1), mà có đặc tính được mô tả trong (i) hoặc (ii) sau đây:

(i) liên kết với vị trí trên vùng 3 của LAG-3 ở người được nhận dạng bởi kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (10); hoặc

(ii) cạnh tranh với kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (10) để liên kết với vùng 3 của LAG-3 ở người;

(14) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (13), mà ở dạng fucoza thấp;

(15) Phân tử chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (14);

(16) Phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (14);

(17) Vector chứa phân tử axit nucleic theo mục (16);

(18) Tế bào chứa phân tử axit nucleic theo mục (16), hoặc vector theo mục (17);

(19) Tế bào mà sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (14);

(20) Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (14), bao gồm bước nuôi cấy tế bào theo mục (18) hoặc (19);

(21) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó được điều chế bằng phương pháp theo mục (20);

- (22) Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (14) và (21), hoặc phân tử theo mục (15);
- (23) Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (14) và (21), hoặc phân tử theo mục (15);
- (24) Dược phẩm theo mục (23), để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh tự miễn;
- (25) Dược phẩm theo mục (24), trong đó bệnh tự miễn là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có các bệnh tự miễn của mô liên kết và hệ cơ xương, các bệnh tự miễn của hệ máu, các bệnh tự miễn của hệ tiêu hóa, các bệnh tự miễn của hệ thần kinh, các bệnh tự miễn của hệ thị giác, các bệnh tự miễn của hệ mạch, các bệnh tự miễn của hệ biểu bì, các bệnh tự miễn của hệ hô hấp, các bệnh tự miễn của hệ nội tiết, viêm gan tự miễn, và viêm thận do rối loạn miễn dịch;
- (26) Dược phẩm theo mục (25), trong đó bệnh tự miễn của mô liên kết và hệ cơ xương là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có viêm khớp dạng thấp, viêm cứng khớp đốt sống, luput ban đỏ toàn thân, bệnh xơ cứng bì, bệnh đa cơ, viêm da cơ, bệnh viêm cơ thể vùi, và bệnh viêm cơ tự phát như bệnh cơ hoại tử miễn dịch trung gian; bệnh tự miễn của hệ máu là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có thiếu máu không tái tạo và ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát; bệnh tự miễn của hệ tiêu hóa là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có bệnh Crohn và viêm loét đại tràng; bệnh tự miễn của hệ thần kinh là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có đa xơ cứng và chứng nhược cơ năng; bệnh tự miễn của hệ thị giác là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có viêm màng mạch nhỏ, viêm giác mạc, và hội chứng Sjogren; bệnh tự miễn của hệ mạch là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có bệnh Behcet và bệnh u hạt Wegener; bệnh tự miễn của hệ biểu bì là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có bệnh vẩy nến, bệnh pemfigut, hội chứng Stevens-Johnson, và bệnh đốm bạch tạng; bệnh tự miễn của hệ hô hấp là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có mạn tính bệnh phổi tắc nghẽn và bệnh phổi mô kẽ; và bệnh tự miễn của hệ nội tiết là một hoặc hai hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm có bệnh tiểu đường typ 1, viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh Graves, và viêm tuyến giáp Hashimoto;
- (27) Dược phẩm theo mục (23), để điều trị hoặc ngăn ngừa sự thải ghép;

(28) Dược phẩm theo mục (27), trong đó sự thải ghép là sự thải ghép và phản ứng vật chủ chống lại sự ghép trong quá trình cấy ghép cơ quan được chọn từ nhóm gồm có tim, thận, gan, tủy xương, và da hoặc mô của nó, và/hoặc bệnh do vật chủ chống lại sự ghép gây ra bởi quá trình cấy ghép của tế bào tạo huyết được chọn từ nhóm gồm có: quá trình cấy ghép của tủy xương; quá trình cấy ghép máu ngoại vi; và quá trình cấy ghép máu dây rốn;

(29) Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (24) đến (28), mà được kết hợp với một hoặc hai hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm gồm có antifolat, chất ức chế calcineurin, corticosteroid, globulin kháng tế bào tủy ức, chất chống chuyển hóa axit nucleic, chất ức chế tổng hợp axit nucleic, chất sinh học hướng đích kháng nguyên trên bề mặt tế bào, chất sinh học hướng đích xytokin hoặc thụ thể xytokin, globulin miễn dịch trong tĩnh mạch, và thay thế huyết tương;

(30) Dược phẩm theo mục (23), để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh dị ứng, u ác tính, và/hoặc nhiễm trùng mạn tính; và bệnh tương tự.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Kháng thể, mảnh liên kết của nó, phân tử chứa chúng, dược phẩm chứa chúng, v.v., mà được đề xuất theo sáng chế có các đặc trưng như cho phép LAG-3 ở người liên kết với phân tử phức hợp tương thích mô chính nhóm II ở người và cho phép LAG-3 ở người tạo ra chức năng ức chế tế bào T ở người thậm chí với sự có mặt của nó, đồng thời có hoạt tính ADCC, hoạt tính làm giảm số lượng tế bào dương tính với LAG-3, hoạt tính ức chế viêm não tủy tự miễn thử nghiệm, hoạt tính liên kết tế bào T được hoạt hóa ở người, v.v., và do đó có thể hữu dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh liên quan đến tế bào dương tính với LAG-3 như các bệnh tự miễn, tốt hơn là trong đó kháng thể ở dạng fucoza thấp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm, bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng, hoạt tính liên kết của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264) đối với tế bào máu chưa trưởng thành PHA ở người biểu hiện LAG-3. Trục tung thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Fig. 2 là đồ thị thể hiện hoạt tính ADCC của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264). Tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người được sử dụng làm tế bào đích, và PBMC ở người được sử dụng làm tế bào đáp ứng.

Fig. 3A là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264) trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II. Rat IgG2b được sử dụng làm đối chứng âm, và kháng thể kháng LAG-3 ở chuột mà được phát triển một cách riêng rẽ và nhận dạng vùng 1 của LAG-3 được sử dụng làm đối chứng dương một cách tương ứng. Mỗi kháng thể được đánh giá ở 10 µg/mL.

Fig. 3B là đồ thị thể hiện kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 IMP731, mà là kháng thể đã biết, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó hoạt tính ức chế trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II. 17B4, mà là kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người có bán sẵn trên thị trường, cũng có hoạt tính ức chế.

Fig. 4 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264) trong thử nghiệm kết dính tế bào 293T-hLAG-3/Raji. IgG2b ở chuột được sử dụng làm đối chứng âm, và kháng thể kháng LAG-3 ở chuột (dòng vô tính 6D7) mà được tạo ra trong Ví dụ 2)-6 và nhận dạng vùng 1 của LAG-3 được sử dụng làm đối chứng dương một cách tương ứng. Mỗi kháng thể được đánh giá ở 10 µg/mL.

Fig. 5A là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm epitop (quyết định kháng nguyên) liên kết LAG-3 ở người của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột (rLA204, rLA212 và rLA225) bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Trục tung thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Liên kết của kháng thể kháng FLAG, được sử dụng làm đối chứng dương, cũng được thể hiện. Mỗi kháng thể được đánh giá ở 10 µg/mL.

Fig. 5B là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm epitop liên kết LAG-3 ở người của kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 IMP731, mà là kháng thể thông thường trong Tài liệu trích dẫn, bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Trục tung thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Huyết thanh miễn dịch thu được từ chuột được tạo miễn dịch trong Ví dụ 1)-1 được sử dụng ở mức pha loãng 500 lần làm huyết thanh miễn dịch. Mỗi trong số các kháng thể khác được đánh giá ở 10 µg/mL. 6D7 là kháng thể kháng LAG-3 ở chuột mà được tạo ra trong Ví dụ 2)-6 và nhận dạng vùng 1 của LAG-3.

Fig. 6 là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm hoạt tính liên kết của kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 cLA212 đối với tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Trục tung thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Fig. 7 là bảng thể hiện khả năng liên kết của kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa làm hằng số phân ly.

Fig. 8 là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm hoạt tính liên kết của 10 loại kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa và kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 cLA212 đối với tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Trục tung thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Fig. 9 là đồ thị thể hiện hoạt tính ADCC của 10 loại kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa và kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 cLA212. Tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người được sử dụng làm tế bào đích, và PBMC ở người được sử dụng làm tế bào đáp ứng.

Fig. 10 là đồ thị nghiên cứu ảnh hưởng của kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hLA212_H3/L2 và kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 IMP731 đối với chức năng ức chế tế bào T của LAG-3. Quá trình sản xuất IL-2 trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được đo khi PBMC ở người được kích thích với SEB trong 4 ngày với sự có mặt của mỗi kháng thể. Mỗi kháng thể được đánh giá ở 10 µg/mL.

Fig. 11] Fig. 11 là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm hoạt tính liên kết của kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hLA212_H4/L2 đối với tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Trục tung thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Fig. 12 là đồ thị thể hiện hoạt tính ADCC của kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hLA212_H4/L2. Tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người được sử dụng làm tế bào đích, và PBMC ở người được sử dụng làm tế bào đáp ứng.

Fig. 13 là đồ thị thể hiện sự biểu hiện của LAG-3 ở người trong chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người phù hợp với sự biểu hiện của LAG-3 ở chuột. Sự biểu hiện LAG-3 ở chuột và ở người trên tế bào T được hoạt hóa thu được bằng cách kích thích tế bào máu trắng thu được từ máu ngoại vi của chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người (Tg) và chuột thể đại đối chứng (Non-Tg) với Con A được nghiên cứu bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng (nhuộm nhiều lần). Kết quả khi tế bào T dương tính CD3 được chọn để phân tích được thể hiện. Góc phân tư của đồ thị điều chỉnh bằng cách sử dụng mẫu không có kháng thể nhuộm đối với LAG-3 ở chuột và ở người.

Fig. 14 là đồ thị thể hiện sự thiếu hụt hoạt tính của kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hLA212_H4/L2 chống lại tế bào biểu hiện LAG-3 in vivo. Trục tung thể hiện mức dương tính LAG-3 ở người trong tế bào T máu ngoại vi của chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người hai ngày sau khi sử dụng kháng thể và Con A. Kháng thể được sử dụng trong màng bụng ở liều 30 mg/kg ngay sau khi sử dụng Con A.

Fig. 15 là đồ thị thể hiện kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hLA212_H4/L2 có hoạt tính ức chế mẫu bệnh tự miễn in vivo. Thang điểm lâm sàng của EAE trong chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người trong đó EAE được cảm ứng và trong đó kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hLA212_H4/L2 hoặc kháng thể đối chứng được sử dụng được thể hiện theo thời gian. Mỗi kháng thể được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 30 mg/kg vào ngày cảm ứng và bảy ngày sau đó.

Fig. 16 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 1).

Fig. 17 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 2).

Fig. 18 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 3).

Fig. 19 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 4).

Fig. 20 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 5).

Fig. 21 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 6).

Fig. 22 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 7).

Fig. 23 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 8).

Fig. 24 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 9).

Fig. 25 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 10).

Fig. 26 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 11).

Fig. 27 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 12).

Fig. 28 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 13).

Fig. 29 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 14).

Fig. 30 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 15).

Fig. 31 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 16).

Fig. 32 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 17).

Fig. 33 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 18).

Fig. 34 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 19).

Fig. 35 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 20).

Fig. 36 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của tín hiệu tiết chuỗi nhẹ ở người và vùng hằng định chuỗi κ ở người (SEQ ID No: 21).

Fig. 37 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của tín hiệu tiết chuỗi nặng ở người và vùng hằng định IgG1 ở người (SEQ ID No: 22).

Fig. 38 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể cLA212 (SEQ ID No: 23).

Fig. 39 là trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể cLA212 (SEQ ID No: 24).

Fig. 40 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể cLA212 (SEQ ID No: 25).

Fig. 41 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể cLA212 (SEQ ID No: 26).

Fig. 42 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng H2 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 27).

Fig. 43 là trình tự axit amin của chuỗi nặng H2 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 28).

Fig. 44 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng H3 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 29).

Fig. 45 là trình tự axit amin của chuỗi nặng H3 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 30).

Fig. 46 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L1 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 31).

Fig. 47 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L1 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 32).

Fig. 48 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L2 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 33).

Fig. 49 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L2 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 34).

Fig. 50 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L3 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 35).

Fig. 51 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L3 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 36).

Fig. 52 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L4 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 37).

Fig. 53 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L4 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 38).

Fig. 54 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L5 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 39).

Fig. 55 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L5 của kháng thể hLA212 (SEQ ID No: 40).

Fig. 56 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 41).

Fig. 57 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 42).

Fig. 58 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 43).

Fig. 59 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 44).

Fig. 60 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 45).

Fig. 61 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA204 (SEQ ID No: 46).

Fig. 62 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 47).

Fig. 63 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 48).

Fig. 64 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 49).

Fig. 65 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 50).

Fig. 66 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 51).

Fig. 67 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA212 (SEQ ID No: 52).

Fig. 68 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 53).

Fig. 69 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 54).

Fig. 70 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 55).

Fig. 71 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 56).

Fig. 72 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 57).

Fig. 73 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA225 (SEQ ID No: 58).

Fig. 74 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 59).

Fig. 75 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 60).

Fig. 76 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 61).

Fig. 77 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 62).

Fig. 78 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 63).

Fig. 79 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA869 (SEQ ID No: 64).

Fig. 80 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 65).

Fig. 81 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 66).

Fig. 82 là trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 67).

Fig. 83 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 68).

Fig. 84 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 69).

Fig. 85 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA1264 (SEQ ID No: 70).

Fig. 86 là đoạn môi RG2AR3 (SEQ ID No: 71).

Fig. 87 là đoạn môi RKR5 (SEQ ID No: 72).

Fig. 88 là đoạn môi 3.3-F1 (SEQ ID No: 73).

Fig. 89 là đoạn môi 3.3-R1 (SEQ ID No: 74).

Fig. 90 là đoạn môi 212H-F (SEQ ID No: 75).

Fig. 91 là đoạn môi 212H-R (SEQ ID No: 76).

Fig. 92 là đoạn môi 212L-F (SEQ ID No: 77).

Fig. 93 là đoạn môi 212L-R (SEQ ID No: 78).

Fig. 94 oligonucleotit LAG-3-H1 (SEQ ID No: 79).

Fig. 95 là oligonucleotit LAG-3-H2 (SEQ ID No: 80).

Fig. 96 là oligonucleotit LAG-3-H3 (SEQ ID No: 81).

Fig. 97 là oligonucleotit LAG-3-H4 (SEQ ID No: 82).

Fig. 98 là oligonucleotit LAG-3-H5 (SEQ ID No: 83).

Fig. 99 là oligonucleotit LAG-3-H6 (SEQ ID No: 84).

Fig. 100 là trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của LAG-3 ở người (SEQ ID No: 85).

Fig. 101 là trình tự axit amin của LAG-3 ở người (SEQ ID No: 86).

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Định nghĩa

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "gen" nghĩa là phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa axit amin của protein, hoặc sợi hỗ trợ của nó. "Gene" có nghĩa bao gồm, ví dụ, polynucleotit, oligonucleotit, ADN, mARN, cADN, và cARN chứa trình tự nucleotit mã hóa axit amin của protein hoặc trình tự nucleotit hỗ trợ cho nó. Gen này là nucleotit sợi đơn, sợi kép, hoặc sợi ba hoặc nhiều hơn. "Gen" cũng có nghĩa bao gồm sự kết hợp của sợi ADN và ARN, hỗn hợp của ribonucleotit (ARN) và deoxyribonucleotit (ADN) trên một sợi nucleotit, và nucleotit sợi kép hoặc sợi ba hoặc nhiều hơn chứa sợi nucleotit này. Ví dụ về "gen LAG-3" theo sáng chế có thể bao gồm ADN, mARN, cADN, và cARN chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của protein LAG-3.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "nucleotit" có cùng nghĩa như "axit nucleic" và "phân tử axit nucleic", và cũng có nghĩa bao gồm, ví dụ, ADN, ARN, mẫu dò, oligonucleotit, polynucleotit, và đoạn môi. Nucleotit này là nucleotit sợi đơn, sợi kép, hoặc sợi ba hoặc nhiều hơn. "Nucleotit" cũng có nghĩa bao gồm sự kết hợp của sợi ADN và ARN, hỗn hợp của ribonucleotit (ARN) và deoxyribonucleotit (ADN) trên một sợi nucleotit, và sự kết hợp của sợi hai sợi hoặc ba hoặc nhiều hơn chứa sợi nucleotit này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit", "peptit", và "protein" có cùng nghĩa.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng nguyên" có cùng nghĩa như "chất sinh miễn dịch".

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào" cũng bao gồm, ví dụ, các tế bào được tạo ra từ các động vật riêng rẽ, tế bào được nuôi cấy lần đầu, tế bào được nuôi cấy nguyên phát, dòng tế bào, tế bào tái tổ hợp, và tế bào vi khuẩn.

Trong bản mô tả này, mỗi trong số các kháng thể mà liên kết với LAG-3 và kháng thể mà nhận dạng LAG-3 còn được gọi là "kháng thể kháng LAG-3" hoặc được viết tắt là "kháng thể LAG-3". Kháng thể kháng LAG-3 bao gồm kháng thể đơn dòng,

kháng thể được khám, kháng thể được nhân hóa, kháng thể người, kháng thể khảm, và tương tự.

Thuật ngữ "mảnh liên kết của kháng thể" trong bản mô tả này nghĩa là mảnh kháng thể mà tạo ra ít nhất một phần chức năng được tạo ra bởi kháng thể ban đầu. Ví dụ về "mảnh liên kết của kháng thể" có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fab, F(ab')₂, scFv, Fab', và globulin miễn dịch chuỗi đơn. Mảnh liên kết của kháng thể này có thể thu được bằng cách xử lý phân tử có chiều dài hoàn chỉnh của protein kháng thể với enzym như papain hoặc pepsin hoặc có thể là protein tái tổ hợp được tạo ra trong tế bào vật chủ thích hợp bằng cách sử dụng gen tái tổ hợp.

Trong bản mô tả này, "vị trí" trong đó kháng thể liên kết, cụ thể là, "vị trí" được nhận dạng bởi kháng thể, nghĩa là một phần peptit hoặc một phần hình dạng trên kháng nguyên được liên kết hoặc được nhận dạng bởi kháng thể. Trong bản mô tả này, vị trí này còn được gọi là vị trí liên kết epitop hoặc kháng thể. Ví dụ về vị trí trên protein LAG-3 được liên kết hoặc được nhận dạng bởi kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế có thể bao gồm một phần peptit hoặc một phần hình dạng trên protein LAG-3.

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể được xác định đối với mỗi trong ba vùng xác định bổ trợ (complementarity determining region - CDR). Vùng xác định bổ trợ còn được gọi là vùng siêu biến. Các vùng này nằm trong vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể. Các vị trí này có cấu trúc sơ cấp biến đổi đặc biệt cao và thường được tách riêng ở ba vị trí trên cấu trúc sơ cấp tương ứng của sợi polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Trong bản mô tả này, vùng xác định bổ trợ của kháng thể được gọi là CDRH1, CDRH2, và CDRH3 từ đầu cuối amino của trình tự axit amin chuỗi nặng đối với vùng xác định bổ trợ của chuỗi nặng và CDRL1, CDRL2, và CDRL3 từ đầu cuối amino của trình tự axit amin chuỗi nhẹ đối với vùng xác định bổ trợ của chuỗi nhẹ. Các vị trí này gần với các vị trí khác trên cấu trúc ba chiều và xác định đặc hiệu đối với kháng nguyên được liên kết. Các phần khác với CDRH1 đến CDRH3 trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng gọi là bộ khung (Vùng bộ khung: sau đây, FR), và các phần từ đầu cuối amino đến nhưng không bao gồm CDRH1, từ ngay sau CDRH1 đến nhưng không bao gồm CDRH2, từ ngay sau CDRH2 đến nhưng không bao gồm CDRH3, và từ ngay sau CDRH3 đến đầu cuối

cacboxy lần lượt được gọi là FRH1 đến FRH4. Tương tự, các phần khác với CDRL1 đến CDRL3 trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ cũng là FR, và các phần từ đầu cuối amino đến nhưng không bao gồm CDRL1, từ ngay sau CDRL1 đến nhưng không bao gồm CDRL2, từ ngay sau CDRL2 đến nhưng không bao gồm CDRL3, và từ ngay sau CDRL3 đến đầu cuối cacboxy lần lượt được gọi là FRL1 đến FRL4. Cụ thể là, trong (trình tự (các)axit amin của) chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4 và FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4 được sắp thẳng hàng một cách liên tục từ mạch nhánh đầu cuối amino đến đầu cuối cacboxy trong thứ tự này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể đột biến" nghĩa là polypeptit mà có trình tự axit amin được tạo ra từ trình tự axit amin của kháng thể ban đầu bằng cách thế, loại bỏ, bổ sung, và/hoặc chèn (sau đây, còn được gọi là "sự đột biến") của (các)axit amin và liên kết với protein LAG-3 theo sáng chế. Các axit amin được đột biến trong kháng thể đột biến là 1, 1 đến 2, 1 đến 3, 1 đến 4, 1 đến 5, 1 đến 6, 1 đến 7, 1 đến 8, 1 đến 9, 1 đến 10, 1 đến 12, 1 đến 15, 1 đến 20, 1 đến 25, 1 đến 30, 1 đến 40, hoặc 1 đến 50. Kháng thể đột biến cũng nằm trong định nghĩa của "kháng thể" theo sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "một vài" trong "1 đến một vài" đề cập đến 3 đến 10.

Ví dụ về hoạt tính hoặc các đặc tính được tạo ra bởi kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm hoạt tính sinh học hoặc đặc tính lý hóa và có thể bao gồm một cách cụ thể các hoạt tính sinh học, hoạt tính liên kết chống lại kháng nguyên hoặc epitop, độ ổn định trong quá trình sản xuất hoặc lưu trữ, và độ ổn định nhiệt.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "lai dưới điều kiện nghiêm ngặt" nghĩa là điều kiện lai bao gồm quá trình lai ở 65°C trong dung dịch bao gồm 5 × SSC, sau đó rửa ở 65°C trong 20 phút trong dung dịch nước bao gồm 2 × SSC-0,1% SDS, ở 65°C trong 20 phút trong dung dịch nước bao gồm 0,5 × SSC-0,1% SDS, và ở 65°C trong 20 phút trong dung dịch nước bao gồm 0,2 × SSC-0,1% SDS, hoặc điều kiện lai tương ứng của chúng. SSC nghĩa là dung dịch nước của 150 mM NaCl-15 mM natri xitrat, và n × SSC nghĩa là SSC với nồng độ n lần.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "hoạt tính gây độc tế bào" đề cập đến một số sự thay đổi bệnh lý xảy ra đối với tế bào và nghĩa là không chỉ sự tổn hại trực tiếp mà bao gồm tất cả các loại phá hủy về mặt chức năng hoặc cấu trúc đối với tế bào, bao gồm sự phân cắt ADN, sự tạo thành các dime bazơ, sự phá hủy nhiễm sắc thể, sự phá hủy đối với bộ giàn phân, và sự giảm về hoạt tính của các enzym.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "hoạt tính gây độc tế bào" nghĩa là hoạt tính mà gây ra hoạt tính gây độc tế bào được đề cập trên đây.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào thiếu hụt kháng thể", còn được gọi là "hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể" hoặc "Hoạt tính ADCC", nghĩa là ảnh hưởng hoặc hoạt tính phá hủy tế bào đích bằng tế bào NK hoặc tế bào tương tự thông qua kháng thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "phản ứng vật chủ chống lại sự ghép" nghĩa là trạng thái siêu miễn dịch của đối tượng nhận được quan sát sau quá trình cấy ghép cơ quan, và phá hủy đối với bộ phận được cấy ghép bởi trạng thái này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh do vật chủ chống lại sự ghép" nghĩa là triệu chứng, gây ra bởi sự tấn công miễn dịch học bằng tế bào được cấy ghép đến đối tượng nhận sau quá trình cấy ghép của tế bào tạo huyết.

2. Kháng nguyên protein

(2-1) Các đặc tính

Protein LAG-3 (mà sau đây còn có thể được gọi một cách đơn giản là "LAG-3") là protein thụ thể xuyên màng và bao gồm vùng ngoại bào bao gồm vùng giống globulin miễn dịch (IgD1 đến 4), mà bao gồm vị trí liên kết phối tử, vùng xuyên màng đơn typ I, và vùng nội bào. LAG-3 có cùng nghĩa như CD223.

Trong bản mô tả này, LAG-3 được tạo ra từ động vật có xương sống, tốt hơn là được tạo ra từ động vật có vú, tốt hơn nữa là được tạo ra từ người.

Protein LAG-3 có các đặc tính sau đây:

(i) liên kết với phân tử phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm II trên tế bào biểu hiện kháng nguyên;

(ii) liên kết với phân tử MHC nhóm II và chuyển tín hiệu ức chế đối với tế bào T biểu hiện phân tử này, để điều hòa chức năng tế bào T âm tính;

(iii) protein LAG-3 theo sáng chế chứa trình tự axit amin (mà sau đây còn được gọi là "trình tự axit amin LAG-3") theo mục bất kỳ trong số các mục từ (a) đến (d) sau đây, bao gồm trình tự axit amin chứa trình tự axit amin LAG-3, hoặc bao gồm trình tự axit amin LAG-3:

(a) trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 86 (Fig. 101);

(b) trình tự axit amin mà có 80% hoặc cao hơn, 82% hoặc cao hơn, 84% hoặc cao hơn, 86% hoặc cao hơn, 88% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 92% hoặc cao hơn, 94% hoặc cao hơn, 96% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn tương đồng với trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 86 (Fig. 101) và nằm trong polypeptit có hoạt tính liên kết phân tử MHC nhóm II;

(c) trình tự axit amin mà được tạo ra từ trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 86 (Fig. 101) bằng cách thế, loại bỏ, bổ sung, hoặc chèn 1 đến 50, 1 đến 45, 1 đến 40, 1 đến 35, 1 đến 30, 1 đến 25, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 axit amin và nằm trong polypeptit có hoạt tính liên kết phân tử MHC nhóm II; và

(d) trình tự axit amin mà được mã hóa bằng trình tự nucleotit của polynucleotit (phân tử axit nucleic) lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với polynucleotit (phân tử axit nucleic) có trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 86 (Fig. 101) và nằm trong polypeptit có hoạt tính liên kết phân tử MHC nhóm II.

Polypeptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (b) đến (d) có thể có hoạt tính khác của LAG-3 ngoài hoạt tính liên kết phân tử MHC nhóm II.

(iv) protein LAG-3 theo sáng chế có thể thu được từ tế bào biểu hiện LAG-3, mô, hoặc mô ung thư, tế bào được tạo ra từ mô, môi trường nuôi cấy tế bào, và tương tự, của động vật có xương sống, tốt hơn là của động vật có vú, tốt hơn nữa là của bộ gặm nhấm như chuột hoặc chuột nhắt và người, thậm chí tốt hơn nữa là của người, chuột nhắt, hoặc chuột.

Sự biểu hiện của LAG-3 được quan sát trong tế bào T được hoạt hóa, vị trí viêm và tương tự in vivo, và hầu như không biểu hiện hoặc mức biểu hiện rất thấp được quan sát trong tế bào của mô bình thường.

Protein LAG-3 theo sáng chế có thể là protein bẩm sinh (không tái tổ hợp) hoặc protein tái tổ hợp. Protein LAG-3 cũng bao gồm sản phẩm dung hợp với peptit hoặc protein khác như chất mang hoặc chất đánh dấu. Protein LAG-3 còn bao gồm dạng được tạo ra bằng sự biến đổi hóa học bao gồm việc bổ sung polyme như PEG và/hoặc bằng sự biến đổi sinh học bao gồm sự biến đổi mạch đường. Ngoài ra, protein LAG-3 theo sáng chế được cho là bao gồm mảnh protein LAG-3. Trong số các mảnh protein LAG-3, các mảnh có các đặc tính được mô tả trong (i) và/hoặc (ii) trên đây gọi là mảnh liên kết protein LAG-3.

(2-2) Gen kháng nguyên

Gen LAG-3 theo sáng chế chứa trình tự nucleotit (mà sau đây còn được gọi là "trình tự gen LAG-3") theo mục bất kỳ trong số các mục từ (a) đến (c) sau đây, bao gồm trình tự nucleotit chứa trình tự gen LAG-3, hoặc bao gồm trình tự gen LAG-3:

(a) trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 86 (Fig. 101);

(b) trình tự nucleotit của polynucleotit (phân tử axit nucleic) mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với polynucleotit (phân tử axit nucleic) bao gồm trình tự nucleotit hỗ trợ cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 86 (Fig. 101) và mã hóa trình tự axit amin của polypeptit có hoạt tính liên kết phân tử MHC nhóm II; và

(c) trình tự nucleotit mà mã hóa trình tự axit amin được tạo ra từ trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 86 (Fig. 101) bằng cách thế, loại bỏ, bổ sung, hoặc chèn 1 đến 50, 1 đến 45, 1 đến 40, 1 đến 30, 1 đến 25, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 base và mã hóa trình tự axit amin của polypeptit có hoạt tính liên kết phân tử MHC nhóm II.

Polypeptit có trình tự axit amin được mã hóa bằng trình tự nucleotit theo mục (b) hoặc (c) có thể có hoạt tính khác của LAG-3 ngoài hoạt tính liên kết phân tử MHC nhóm II.

Sự biểu hiện và mức biểu hiện của gen LAG-3 có thể được thử nghiệm với phiên mã gen LAG-3 hoặc protein LAG-3 làm chỉ số. Chỉ số trước có thể được xác định lần lượt bằng RT-PCR, quá trình lai Northern Blot, hoặc tương tự, đồng thời

latter chỉ số có thể được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch như phương pháp đếm tế bào theo dòng, Phương pháp Western Blot, nhuộm hóa mô miễn dịch, hoặc tương tự.

(2-3) Quá trình điều chế protein kháng nguyên

Protein LAG-3 theo sáng chế có thể được điều chế bằng quá trình tinh chế hoặc quá trình phân lập từ động vật mô (bao gồm dịch lỏng cơ thể), tế bào được tạo ra từ mô, hoặc môi trường nuôi cấy tế bào, tái tổ hợp gen, quá trình dịch mã in vitro, tổng hợp hóa học, v.v.

(2-3-1) Quá trình tinh chế hoặc quá trình phân lập của LAG-3 không tái tổ hợp

Protein LAG-3 không tái tổ hợp có thể được tinh chế hoặc được phân lập từ tế bào biểu hiện LAG-3. Ví dụ về tế bào biểu hiện LAG-3 có thể bao gồm các tế bào được mô tả trong (iv) của (2-1), nhưng nguồn của protein LAG-3 không tái tổ hợp không bị giới hạn chỉ ở đó.

Quá trình tinh chế hoặc quá trình phân lập từ mô này, tế bào, môi trường nuôi cấy tế bào, hoặc tương tự, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thể được thực hiện bằng cách kết hợp các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như cắt phân đoạn và sắc ký.

(2-3-2) Quá trình điều chế protein tái tổ hợp LAG-3

Protein LAG-3 theo sáng chế có thể cũng được điều chế ở dạng tái tổ hợp. Cụ thể là, tế bào vật chủ được chuyển nhiễm với gen mã hóa trình tự axit amin của protein LAG-3 hoặc mảnh protein LAG-3, và protein LAG-3 có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào. Ngoài ra, protein LAG-3 có thể được biểu hiện không chỉ ở dạng phân tử có cùng đầu cuối amino (đầu cuối N) và/hoặc đầu cuối cacboxy (đầu cuối C) ở dạng bản sinh, mà còn ở dạng protein dung hợp với tín hiệu gây tiết, tín hiệu định vị nội bào, chất đánh dấu đối với quá trình tinh chế theo ái lực, hoặc peptit hỗ trợ. Protein LAG-3 có thể được tinh chế hoặc được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp này bằng phương pháp kết hợp thích hợp như cắt phân đoạn và sắc ký được mô tả trong (2-3-1) Quá trình tinh chế hoặc quá trình phân lập của protein LAG-3 không tái tổ hợp. Ngoài ra, dung dịch chứa protein LAG-3 có thể được thay đổi đậm và/hoặc nồng độ bằng cách sử dụng sắc ký lọc gel hoặc bộ phân tích nồng độ như Centriprep.

(2-3-3) Quá trình dịch mã in vitro

Protein LAG-3 theo sáng chế có thể cũng được điều chế bằng quá trình dịch mã in vitro. Phương pháp dịch mã này không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là phương pháp này sử dụng hệ dịch mã không tế bào bao gồm enzym cần thiết đối với quá trình phiên mã và dịch mã, cơ chất, và chất tạo năng lượng. Ví dụ về nó có thể bao gồm phương pháp sử dụng hệ dịch mã nhanh (Rapid Translation System - RTS) được sản xuất bởi Roche Diagnostics K.K.

(2-3-4) Tổng hợp hóa học

Protein LAG-3 theo sáng chế có thể cũng được điều chế bằng tổng hợp hóa học. Ví dụ về phương pháp tổng hợp hóa học có thể bao gồm phương pháp tổng hợp peptit pha rắn như phương pháp tổng hợp Fmoc và Boc.

3. Kháng thể

(3-1) Phân loại kháng thể

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng. Ví dụ về kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể có nguồn gốc không từ người, động vật (kháng thể không từ người, động vật), kháng thể có nguồn gốc từ người (kháng thể người), kháng thể được khảm (kháng thể khảm), và kháng thể được nhân hóa.

Ví dụ về kháng thể không từ người, động vật có thể bao gồm kháng thể được tạo ra từ động vật có xương sống như động vật có vú và chim. Ví dụ về kháng thể có nguồn gốc từ động vật có vú có thể bao gồm kháng thể có nguồn gốc từ bộ gặm nhấm như kháng thể chuột nhắt và kháng thể chuột. Ví dụ về kháng thể có nguồn gốc từ chim có thể bao gồm kháng thể gà. Ví dụ về kháng thể chuột đơn dòng kháng LAG-3 ở người có thể bao gồm rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264.

Ví dụ về kháng thể được khảm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể chứa vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể không từ người, động vật được liên kết với vùng hằng định kháng thể người (globulin miễn dịch người). Ví dụ về kháng thể được khảm chứa vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể không từ người, động vật được liên kết với vùng hằng định kháng thể người có thể bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ được tạo ra từ kháng thể chuột đơn

dòng rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, hoặc rLA1264, và có vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người (mà lần lượt được gọi là "cLA204", "cLA212", "cLA225", "cLA869", hoặc "cLA1264").

Ví dụ về kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể người (vùng biến đổi globulin miễn dịch người) được ghép với CDR trong vùng biến đổi của kháng thể không từ người, động vật, kháng thể người được ghép với CDR cũng như với một phần trình tự của FRs của kháng thể không từ người, động vật, và kháng thể có axit amin của kháng thể người hoặc axit amin khác được thế cho một hoặc hai hoặc nhiều kháng thể axit amin có nguồn gốc không từ người, động vật trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể (được nhân hóa) người. Ví dụ về CDR trong vùng biến đổi của kháng thể không từ người, động vật có thể bao gồm CDRH1 đến CDRH3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng và CDRL1 đến CDRL3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ được tạo ra từ rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, hoặc rLA1264 được đề cập trên đây. Ví dụ về kháng thể được nhân hóa chứa CDRH1 đến CDRH3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng và CDRL1 đến CDRL3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ được tạo ra từ rLA212 có thể bao gồm hLA212_H2/L1 đến H2/L5, hLA212_H3/L1 đến H3/L5, và hLA212_H4/L2.

Kháng thể người không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là kháng thể này nhận dạng kháng nguyên theo sáng chế, nhưng ví dụ về nó có thể bao gồm kháng thể người liên kết với cùng vị trí như kháng thể có CDR của kháng thể theo sáng chế, và kháng thể người liên kết với cùng vị trí trên LAG-3 như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể không từ người, động vật, kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa, và kháng thể tương tự, và kháng thể cạnh tranh với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này để liên kết với LAG-3.

Kháng thể theo sáng chế có thể chứa các phần được tạo ra từ các kháng thể khác nhau miễn là kháng thể này có hoạt tính liên kết LAG-3. Ví dụ về kháng thể này có thể bao gồm kháng thể chứa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được thay đổi trong số các kháng thể khác nhau, kháng thể chứa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chiều dài hoàn chỉnh được thay đổi trong số chúng, kháng thể chứa vùng biến đổi hoặc vùng hằng định được thay đổi trong số chúng, và kháng thể chứa tất cả hoặc một số CDR được

thay đổi trong số chúng. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ của kháng thể khảm có thể được tạo ra từ kháng thể khác nhau theo sáng chế. CDRH1 đến CDRH3 và CDRL1 đến CDRL3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa có thể được tạo ra từ hai hoặc nhiều kháng thể khác nhau theo sáng chế. CDRH1 đến CDRH3 và CDRL1 đến CDRL3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ của kháng thể người có thể là dạng kết hợp của CDR được mang bởi hai hoặc nhiều kháng thể khác nhau theo sáng chế. Mỗi kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó bao gồm các phần này được tạo ra từ các kháng thể khác nhau có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., sau đây được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

Ví dụ về isotyp (kiểu tương đương) của kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn một cách cụ thể ở, IgG như IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, IgM, IgA như IgA1 và IgA2, IgD, và IgE và có thể tốt hơn là bao gồm IgG và IgM. Isotyp và nhóm phụ của kháng thể đơn dòng có thể được xác định bằng, ví dụ, thử nghiệm Ouchterlony, xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (sau đây, được gọi là "ELISA"), hoặc radio thử nghiệm miễn dịch radio (sau đây, được gọi là "RIA"). Kit có bán sẵn trên thị trường để xác định (ví dụ, Mouse Typer Kit; Bio-Rad Laboratories, Inc., và RAT MONOCLONAL ISOTYPING TEST KIT: AbD Serotec) cũng có thể hữu dụng.

(3-2) Liên kết đặc hiệu của kháng thể

Kháng thể theo sáng chế nhận dạng protein LAG-3. Nói cách khác, kháng thể theo sáng chế liên kết với protein LAG-3. Kháng thể này còn được gọi là "kháng thể kháng LAG-3". Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế nhận dạng một cách đặc hiệu protein LAG-3. Nói cách khác, kháng thể theo sáng chế tốt hơn là liên kết với một cách đặc hiệu protein LAG-3 (các đặc tính trên đây còn được gọi là "Hoạt tính liên kết LAG-3" của kháng thể). Tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế liên kết với một cách

đặc hiệu (các)vùng ngoại bào của protein LAG-3, ngoài ra tốt hơn nữa là, kháng thể liên kết với một cách đặc hiệu vùng giống globulin miễn dịch (mà sau đây còn được gọi là "vùng giống Ig") của protein LAG-3, ngoài ra tốt hơn nữa là, kháng thể liên kết với một cách đặc hiệu Vùng giống Ig 3.

Trong bản mô tả này, "nhận dạng một cách đặc hiệu", cụ thể là, "liên kết một cách đặc hiệu", nghĩa là liên kết mà không hấp thụ một cách đặc hiệu. Ví dụ về tiêu chuẩn để xác định liệu liên kết đặc hiệu hoặc không có thể bao gồm hằng số phân ly (sau đây, được gọi là "KD"). Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế có giá trị KD là 1×10^{-5} hoặc thấp hơn, 5×10^{-6} hoặc thấp hơn, 2×10^{-6} hoặc thấp hơn, hoặc 1×10^{-6} hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 5×10^{-7} hoặc thấp hơn, 2×10^{-7} hoặc thấp hơn, hoặc 1×10^{-7} hoặc thấp hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 5×10^{-8} hoặc thấp hơn, 2×10^{-8} hoặc thấp hơn, hoặc 1×10^{-8} hoặc thấp hơn, ngoài ra tốt hơn nữa là 5×10^{-9} hoặc thấp hơn, 2×10^{-9} hoặc thấp hơn, hoặc 1×10^{-9} hoặc thấp hơn, hầu hết các tốt hơn là 5×10^{-10} hoặc thấp hơn, 2×10^{-10} hoặc thấp hơn, hoặc 1×10^{-10} hoặc thấp hơn đối với protein LAG-3.

Trong bản mô tả này, liên kết của kháng thể đối kháng nguyên có thể được thử nghiệm hoặc được xác định bằng phân tích ELISA, RIA, cộng hưởng plasmon bề mặt (sau đây, được gọi là "SPR"), hoặc tương tự. Ví dụ về thiết bị được sử dụng trong SPR phân tích có thể bao gồm BIAcore(TM) (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Corp.), ProteOn(TM) (được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.), SPR-Navi(TM) (được sản xuất bởi BioNavis Oy Ltd.), Spreeta(TM) (được sản xuất bởi Texas Instruments Inc.), SPRi-Plex II(TM) (được sản xuất bởi Horiba, Ltd.), và Autolab SPR(TM) (được sản xuất bởi Metrohm Japan Ltd.). Liên kết của kháng thể đối kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt tế bào có thể được thử nghiệm bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng, tế bào-ELISA, hoặc tương tự.

(3-3) Hoạt tính gây độc tế bào của kháng thể

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế có hoạt tính gây độc tế phụ thuộc kháng thể (ADCC), tốt hơn là có hoạt tính ADCC in vitro, tốt hơn nữa là có hoạt tính ADCC chống lại LAG-3-biểu hiện T tế bào. Kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế có thể có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) và/hoặc hoạt tính thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) ngoài hoạt tính ADCC.

Hoạt tính ADCC có thể được thử nghiệm bằng cách phương pháp đã biết. Tế bào biểu hiện kháng nguyên liên quan (tế bào đích) và tế bào đáp ứng có khả năng tiêu diệt tế bào đích được sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính ADCC. Tế bào đáp ứng nhận dạng vùng Fc của kháng thể liên kết với tế bào đích thông qua thụ thể Fcγ. Tế bào đáp ứng tiêu diệt tế bào đích bằng tín hiệu được chuyển đổi từ thụ thể Fcγ. Trong trường hợp thử nghiệm hoạt tính ADCC của kháng thể có vùng Fc có nguồn gốc từ người, tế bào NK ở người được sử dụng làm tế bào đáp ứng. Tế bào NK ở người có thể được điều chế từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (PBMCs) bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án khác, PBMCs có thể được sử dụng trực tiếp làm tế bào đáp ứng.

(3-4) Hoạt tính làm giảm lượng tế bào dương tính với LAG-3 in vivo của kháng thể

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế làm giảm lượng tế bào dương tính với LAG-3, tốt hơn là làm giảm lượng tế bào dương tính với LAG-3 in vivo, và tốt hơn nữa là làm giảm lượng tế bào dương tính với LAG-3 in vivo ở dạng fucoza thấp.

Tế bào dương tính với LAG-3 bao gồm tế bào được cường bức để biểu hiện LAG-3 và tế bào có LAG-3 sự biểu hiện được cảm ứng bằng cách kích thích, nhưng không bị giới hạn chỉ ở đó, miễn là chúng là tế bào biểu hiện LAG-3.

Các tế bào dương tính với LAG-3 có thể được đếm bằng phương pháp truyền thống như phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Trong bản mô tả này, "dạng fucoza thấp" nghĩa là trạng thái trong đó (i) lượng fucoza (gốc fucoza) liên kết với kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó trong liên kết với mạch đường loại phức hợp liên kết N-glycosit nhỏ hơn lượng fucoza (gốc fucoza) liên kết với kháng thể ban đầu (gốc) hoặc mảnh liên kết của nó trong mạch đường loại phức hợp liên kết N-glycosit, (ii) lượng fucoza (gốc fucoza) liên kết với kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó trong mạch đường loại phức hợp liên kết N-glycosit nhỏ hơn lượng fucoza (gốc fucoza) tự liên kết với kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó trong mạch đường loại phức hợp liên kết N-glycosit, hoặc (iii) lượng fucoza (gốc fucoza) hoặc mạch đường chứa fucoza (gốc fucoza) liên kết với kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó trong mạch đường loại phức hợp liên kết N-glycosit ở hoặc thấp hơn

giới hạn phát hiện trong phân tích vật lý hoặc hóa học (tốt hơn là phổ khối). Trong trường hợp trong đó lượng fucoza (gốc fucoza) liên kết với kháng thể được biến đổi hoặc mảnh liên kết của nó trong mạch đường loại phức hợp liên kết N-glycosit nhỏ hơn lượng trước khi biến đổi, kháng thể được biến đổi hoặc mảnh liên kết của nó được hiểu là ở "dạng fucoza thấp". Dạng được biến đổi hLA212_H4/L2 được mô tả sau đây, mà là kháng thể được nhân hóa theo sáng chế, là một khía cạnh về kháng thể ở dạng fucoza thấp. Kháng thể hoặc mảnh liên kết ở dạng fucoza thấp có ái lực cao hơn đối với thụ thể Fcγ IIIA và hoạt tính ADCC mạnh hơn khi không ở dạng fucoza thấp.

(3-5) Hoạt tính ức chế viêm não tủy tự miễn thử nghiệm in vivo của kháng thể

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế có hoạt tính ức chế viêm não tủy, tốt hơn là có hoạt tính ức chế viêm não tủy tự miễn thử nghiệm in vivo, tốt hơn nữa là có hoạt tính ức chế viêm não tủy tự miễn thử nghiệm in vivo ở dạng fucoza thấp.

Trong bản mô tả này, viêm não tủy tự miễn thử nghiệm nghĩa là viêm não tủy được cảm ứng bằng cách tiêm peptit được tạo ra từ glycoprotein myelin tế bào ít nhánh (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein - MOG) mà là một của protein cấu thành myelin thần kinh trung ương, đối với chuột cùng với Freund's Adjuvant.

Hoạt tính ức chế viêm não tủy tự miễn thử nghiệm có thể được thử nghiệm bằng cách quan sát hàng ngày của thang điểm lâm sàng mà phản ánh mức độ bại liệt. Thang điểm lâm sàng có thể được điều chỉnh, ví dụ, như sau:

Điểm 0: Không triệu chứng;

Điểm 1: Di khập khiễng;

Điểm 2: Dáng đi bất thường hoặc mất phản xạ ưỡn;

Điểm 3: Bại chân sau;

Điểm 4: Liệt một phần của chân trước; và

Điểm 5: Chết hoặc làm chết nhân đạo.

(3-6) Hoạt tính liên kết tế bào T được hoạt hóa ở người của kháng thể

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế liên kết với tế bào T được hoạt hóa ở người, tốt hơn là liên kết với tế bào T được hoạt hóa ở người dương tính LAG-3. Liên kết của kháng thể đối với tế bào T được hoạt hóa ở người có thể được thử nghiệm hoặc được phát hiện, ví dụ, bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

(3-7) Sự có mặt của kháng thể cho phép LAG-3 ở người liên kết với phân tử MHC nhóm II ở người

Theo một khía cạnh theo sáng chế, LAG-3 ở người có thể liên kết với phân tử MHC nhóm II ở người với sự có mặt của kháng thể, hoặc kháng thể theo sáng chế không ức chế liên kết của LAG-3 ở người đối với phân tử MHC nhóm II ở người.

Liên kết của protein dung hợp của vùng ngoại bào của phân tử LAG-3 và một phần Fc của IgG đối với tế bào Raji mà biểu hiện nội sinh cao phân tử MHC nhóm II có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách thử nghiệm hoặc phát hiện bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

(3-8) Sự có mặt của kháng thể cho phép LAG-3 ở người tạo ra chức năng ức chế tế bào T ở người

Theo một khía cạnh khác, LAG-3 ở người tạo ra chức năng ức chế tế bào T ở người với sự có mặt của kháng thể theo sáng chế.

Thuật ngữ "chức năng ức chế tế bào T" trong bản mô tả này nghĩa là để giảm hoặc ngăn ngừa lượng xytokin được tạo ra do kích thích tế bào T.

Chức năng ức chế tế bào T bằng LAG-3 ở người có thể được thử nghiệm, ví dụ, bằng cách định lượng xytokin được tạo ra khi tế bào T ở người được kích thích để cảm ứng sự biểu hiện LAG-3.

Trong bản mô tả này, sự kích thích của tế bào T ở người không bị giới hạn một cách cụ thể, nhưng ví dụ về nó có thể bao gồm kích thích với kháng nguyên đặc hiệu, kháng thể kháng CD3, dạng kết hợp của kháng thể kháng CD3 và kháng thể kháng CD28, siêu kháng nguyên, tế bào được tạo ra từ phân tử cho khác, tốt hơn là kích thích với Staphylococcal Enterotoxin B, tế bào được tạo ra từ phân tử cho khác có MHC khác, và tương tự.

Ví dụ về xytokin có thể bao gồm xytokin được tạo ra từ tế bào T được hoạt hóa, tốt hơn là các interleukin và interferon, tốt hơn nữa là interleukin 2 (IL-2) và interferon γ .

(3-9) Kháng thể đơn dòng

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng kháng LAG-3 và mảnh liên kết của nó. Kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng được tạo ra từ động vật không phải

người như kháng thể chuột, kháng thể chuột, kháng thể thỏ, kháng thể gà, và kháng thể cá, kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa, kháng thể người, mảnh liên kết của nó, và dạng được biến đổi của nó. Trong số chúng, ví dụ về kháng thể chuột đơn dòng có thể bao gồm rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264.

rLA204 là kháng thể chuột đơn dòng kháng LAG-3 ở người thu được bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA204 được mô tả trong SEQ ID No: 1 (Fig. 16), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 2 (Fig. 17). Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA204 được mô tả trong SEQ ID No: 3 (Fig. 18), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 4 (Fig. 19). Trình tự axit amin của CDRH1 của rLA204 được mô tả trong SEQ ID No: 41 (Fig. 56), trình tự axit amin của CDRH2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 42 (Fig. 57), trình tự axit amin của CDRH3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 43 (Fig. 58), trình tự axit amin của CDRL1 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 44 (Fig. 59), trình tự axit amin của CDRL2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 45 (Fig. 60), và trình tự axit amin của CDRL3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 46 (Fig. 61) một cách tương ứng.

rLA212 là kháng thể chuột đơn dòng kháng LAG-3 ở người thu được theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA212 được mô tả trong SEQ ID No: 5 (Fig. 20), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 6 (Fig. 21). Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA212 được mô tả trong SEQ ID No: 7 (Fig. 22), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 8 (Fig. 23). Trình tự axit amin của CDRH1 của rLA212 được mô tả trong SEQ ID No: 47 (Fig. 62), trình tự axit amin của CDRH2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 48 (Fig. 63), trình tự axit amin của CDRH3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 49 (Fig. 64), trình tự axit amin của CDRL1 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 50 (Fig. 65), trình tự axit amin của CDRL2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 51 (Fig. 66), và trình tự axit amin của CDRL3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 52 (Fig. 67) một cách tương ứng.

rLA225 là kháng thể chuột đơn dòng kháng LAG-3 ở người thu được theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi

nặng của rLA225 được mô tả trong SEQ ID No: 9 (Fig. 24), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 10 (Fig. 25). Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA225 được mô tả trong SEQ ID No: 11 (Fig. 26), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 12 (Fig. 27). Trình tự axit amin của CDRH1 của rLA225 được mô tả trong SEQ ID No: 53 (Fig. 68), trình tự axit amin của CDRH2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 54 (Fig. 69), trình tự axit amin của CDRH3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 55 (Fig. 70), trình tự axit amin của CDRL1 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 56 (Fig. 71), trình tự axit amin của CDRL2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 57 (Fig. 72), và trình tự axit amin của CDRL3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 58 (Fig. 73).

rLA869 là kháng thể chuột đơn dòng kháng LAG-3 ở người thu được theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA869 được mô tả trong SEQ ID No: 13 (Fig. 28), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 14 (Fig. 29). Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA869 được mô tả trong SEQ ID No: 15 (Fig. 30), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 16 (Fig. 31). Trình tự axit amin của CDRH1 của rLA869 được mô tả trong SEQ ID No: 59 (Fig. 74), trình tự axit amin của CDRH2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 60 (Fig. 75), trình tự axit amin của CDRH3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 61 (Fig. 76), trình tự axit amin của CDRL1 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 62 (Fig. 77), trình tự axit amin của CDRL2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 63 (Fig. 78), và trình tự axit amin của CDRL3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 64 (Fig. 79).

rLA1264 là kháng thể chuột đơn dòng kháng LAG-3 ở người thu được theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA1264 được mô tả trong SEQ ID No: 17 (Fig. 32), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 18 (Fig. 33). Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA1264 được mô tả trong SEQ ID No: 19 (Fig. 34), và trình tự axit amin của nó được mô tả trong SEQ ID No: 20 (Fig. 35). Trình tự axit amin của CDRH1 của rLA1264 được mô tả trong SEQ ID No: 65 (Fig. 80), trình tự axit amin của CDRH2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 66 (Fig. 81), trình tự axit amin của

CDRH3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 67 (Fig. 82), trình tự axit amin của CDRL1 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 68 (Fig. 83), trình tự axit amin của CDRL2 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 69 (Fig. 84), và trình tự axit amin của CDRL3 của nó được mô tả trong SEQ ID No: 70 (Fig. 85).

Kháng thể đột biến theo sáng chế tốt hơn là có, ví dụ, độ nhạy được làm giảm với sự phân hủy protein hoặc oxy hóa, hoạt tính sinh học được cải thiện, khả năng liên kết với kháng nguyên được cải thiện, hoặc các đặc tính lý hóa hoặc chức năng được tạo ra từ đó. Ví dụ về kháng thể đột biến này có thể bao gồm kháng thể có trình tự axit amin được tạo ra từ trình tự axit amin của kháng thể ban đầu bằng cách thế axit amin bảo toàn của 1 hoặc 2 hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 1 đến một vài axit amin. Thế axit amin bảo toàn là sự thế mà xảy ra trong nhóm axit amin có mạch nhánh axit amin có liên quan.

Nhóm axit amin được ưu tiên là như sau: nhóm axit bao gồm axit aspartic và axit glutamic; nhóm bazơ bao gồm lysin, arginin, và histidin; nhóm không phân cực bao gồm alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, và tryptophan; và họ phân cực không mang điện bao gồm glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, và tyrosin. Nhóm axit amin được ưu tiên khác là như sau: nhóm hydroxy béo bao gồm serin và threonin; nhóm bao gồm amit bao gồm asparagin và glutamin; nhóm béo bao gồm alanin, valin, leuxin, và isoleuxin; và nhóm thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan, và tyrosin. Sự thế axit amin này trong kháng thể đột biến tốt hơn được thực hiện mà không làm giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của kháng thể ban đầu (gốc).

Axit aspartic trong protein được chuyển hóa một cách dễ dàng thành axit isoaspartic bằng cách isome hóa khi axit amin được liên kết trên đó trên nhánh đầu cuối C có mạch bên nhỏ. Mặt khác, asparagin được chuyển hóa một cách dễ dàng thành axit aspartic bằng cách deamid hóa và có thể còn được chuyển hóa thành axit isoaspartic bằng cách isome hóa. Sự tiến triển của quá trình isome hóa hoặc deamid hóa này có thể ảnh hưởng độ ổn định của protein. Do đó, axit aspartic hoặc asparagin trong protein hoặc, ví dụ, axit amin gần kề trên đó, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thế được thế bằng cách axit amin khác để tránh quá trình isome hóa hoặc

deamit hóa này. Tốt hơn là, kháng thể đột biến có sự thể axit amin này duy trì hoạt tính liên kết kháng nguyên của kháng thể ban đầu.

Sáng chế còn bao gồm, ví dụ: kháng thể đột biến có trình tự axit amin được tạo ra từ trình tự axit amin của rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, hoặc rLA1264 theo sáng chế bằng cách thể axit amin bảo toàn; và kháng thể chuột nhất, kháng thể chuột, kháng thể được khảm, kháng thể được nhân hóa, hoặc kháng thể người chứa CDR có trình tự axit amin trong đó sự đột biến axit amin bảo toàn được bổ sung vào trong trình tự axit amin của bất kỳ trong số CDRH1 đến CDRH3 và CDRL1 đến CDRL3 được tạo ra từ rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, hoặc rLA1264.

Thể đột biến của kháng thể theo sáng chế bao gồm thể đột biến kháng thể liên kết LAG-3 ở người chứa CDRH1 đến CDRH3 và CDRL1 đến CDRL3 có trình tự axit amin trong đó 1 đến một vài, tốt hơn là 1 đến 3, tốt hơn nữa là 1 hoặc 2, tốt nhất là 1 (các) axit amin được thể bằng cách (các) axit amin khác nhau trong trình tự axit amin của bất kỳ một hoặc hai hoặc nhiều trong số CDRH1 đến CDRH3 và CDRL1 đến CDRL3 được tạo ra từ rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, hoặc rLA1264 theo sáng chế.

Kháng thể đột biến cũng bao gồm kháng thể có CDRH1 đến CDRH3 và CDRL1 đến CDRL3 được tạo ra từ các kháng thể. Ví dụ về thể đột biến này có thể bao gồm kháng thể đột biến chứa CDRH3 được tạo ra từ kháng thể cụ thể và CDRH1, CDRH2, và CDRL1 đến CDRL3 được tạo ra từ kháng thể khác.

“Kháng thể” theo sáng chế còn bao gồm các kháng thể đột biến này.

Vùng hằng định của kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể. Tốt hơn là, vùng hằng định được tạo ra từ kháng thể người được sử dụng trong kháng thể theo sáng chế để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở người. Ví dụ về vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể người có thể bao gồm C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4, C μ , C δ , C α 1, C α 2, và C ϵ . Ví dụ về vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể người có thể bao gồm C κ và C λ .

(3-10) Kháng thể khảm

Kháng thể kháng LAG-3 được khảm hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt

hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin của chuỗi nặng của cLA212 được lấy làm ví dụ làm kháng thể khảm người-chuột theo sáng chế và trình tự nucleotit và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của nó lần lượt được thể hiện trong SEQ ID No: 23, 24, 25, và 26 (Các Fig. 38, 39, 40, và 41). Mỗi nucleotit vị trí 1 đến 57 trong trình tự nucleotit của chuỗi nặng và các vị trí axit amin 1 đến 19 trong trình tự axit amin của chuỗi nặng thể hiện trình tự tín hiệu, mà thường không có trong trình tự nucleotit và trình tự axit amin của hầu hết các chuỗi nặng trưởng thành. Tương tự, mỗi nucleotit vị trí 1 đến 60 trong trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ và các vị trí axit amin 1 đến 20 trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ thể hiện trình tự tín hiệu, mà thường không có trong trình tự nucleotit và trình tự axit amin của hầu hết các chuỗi nhẹ trưởng thành.

Kháng thể khảm người-chuột cLA204, cLA225, cLA869, và cLA1264 còn được mô tả trong bản mô tả này.

(3-11) Mảnh liên kết của kháng thể

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất mảnh liên kết của kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế. Mảnh liên kết của kháng thể nghĩa là mảnh mà duy trì ít nhất một phần chức năng của kháng thể. Ví dụ về này chức năng của kháng thể có thể thường bao gồm hoạt tính liên kết kháng nguyên, hoạt tính điều hòa hoạt tính kháng nguyên, và hoạt tính gây độc tế phụ thuộc kháng thể (ADCC) . Tốt hơn là, mảnh liên kết của kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

Mảnh liên kết của kháng thể không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là mảnh của kháng thể duy trì ít nhất một phần hoạt tính của kháng thể. Ví dụ về nó có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fab, F(ab')₂, Fv, Fv mạch đơn (scFv) chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fvs được liên kết thông qua chất liên kết thích hợp, diabody (dimer của mảnh của globin miễn dịch), kháng thể thẳng, kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ mảnh kháng thể, và Fab', mà là mảnh đơn trị của vùng biến đổi kháng thể thu được bằng cách xử lý F(ab')₂ dưới các điều kiện khử. Mảnh liên kết của kháng thể theo sáng chế cũng có nghĩa bao gồm phân tử chứa mảnh của kháng thể theo sáng chế cũng như các phần khác, như scFv duy trì phần liên kết.

Phân tử mà được tạo ra từ protein kháng thể bằng cách loại bỏ 1 đến một vài hoặc nhiều (các) axit amin ở đầu cuối amino của nó và/hoặc đầu cuối cacboxy và duy trì ít nhất một phần chức năng của kháng thể cũng được bao gồm trong định nghĩa của mảnh liên kết của kháng thể. Ví dụ, chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra bằng cách tế bào động vật có vú được nuôi cấy được xác định là không có gốc lysin ở đầu cuối cacboxy (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)). Ngoài ra, chuỗi nặng của kháng thể này được xác định là thiếu hai gốc axit amin (glyxin và lysin) ở đầu cuối cacboxy và thay vào đó có gốc prolin được amit hóa ở đầu cuối cacboxy (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Tuy nhiên, việc loại bỏ và biến đổi trong trình tự chuỗi nặng này không ảnh hưởng đến khả năng của kháng thể để liên kết với kháng nguyên hoặc tác dụng hoặc chức năng của nó (sự hoạt hóa bổ thể, tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể, v.v.). Dạng được biến đổi này của mảnh liên kết của kháng thể cũng nằm trong định nghĩa của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, hoặc dạng được biến đổi (sẽ được mô tả sau đây) của nó.

Kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh liên kết của nó có thể là kháng thể đa đặc hiệu có đặc hiệu đối với ít nhất 2 loại kháng nguyên khác nhau. Kháng thể đa đặc hiệu không chỉ giới hạn ở kháng thể đặc hiệu kép, mà liên kết với 2 loại kháng nguyên khác nhau, và kháng thể có đặc hiệu đối với 3 hoặc nhiều loại kháng nguyên khác nhau cũng được bao gồm trong định nghĩa của "kháng thể đa đặc hiệu" theo sáng chế.

Kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế có thể là kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh hoặc mảnh liên kết của nó (ví dụ, kháng thể F(ab')₂ đặc hiệu kép). Kháng thể đặc hiệu

kép có thể cũng được điều chế bằng cách liên kết chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (cặp HL) của hai loại kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể thu được bằng cách dung hợp hai hoặc nhiều loại tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng để điều chế tế bào dung hợp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép (Millstein et al., *Nature* (1983) 305, p. 537-539). Kháng thể đa đặc hiệu có thể cũng được điều chế theo cách tương tự như trên đây.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế là kháng thể chuỗi đơn (Fv chuỗi đơn; sau đây, được gọi là "scFv"). ScFv thu được bằng cách liên kết các vùng V của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể thông qua liên kết polypeptit (Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113, Rosenberg and Moore, ed., Springer Verlag, New York, p. 269-315 (1994); và *Nature Biotechnology* (2005), 23, p. 1126-1136). Ngoài ra, bi-scFv chứa hai scFvs được liên kết thông qua liên kết polypeptit có thể hữu dụng làm kháng thể đặc hiệu kép. Theo một phương án khác, multi-scFv chứa ba hoặc nhiều scFvs có thể hữu dụng làm kháng thể đa đặc hiệu.

Sáng chế bao gồm globulin miễn dịch chuỗi đơn chứa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chiều dài hoàn chỉnh của kháng thể được liên kết thông qua chất liên kết thích hợp (Lee, H-S, et al., *Molecular Immunology* (1999), 36, p. 61-71; và Shirrmann, T. et al., *mAbs* (2010), 2 (1) p. 1-4). Globulin miễn dịch chuỗi đơn này có thể được dime hóa để nhờ đó duy trì cấu trúc và hoạt tính tương tự với các globulin miễn dịch chuỗi đơn của kháng thể, mà có nguồn gốc là tetrame. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể mà có một vùng biến đổi chuỗi nặng duy nhất và không có trình tự chuỗi nhẹ. Kháng thể này, gọi là kháng thể đơn vùng (sdAb) hoặc kháng thể thu nhỏ, đã được thông báo là duy trì khả năng liên kết với kháng nguyên (Muyldemans S. et al., *Protein Eng.* (1994), 7 (9), 1129-35; và Hamers-Casterman C. et al., *Nature* (1993), 363 (6428), 446-8). Các kháng thể này cũng được bao gồm trong định nghĩa của mảnh chức năng của kháng thể theo sáng chế.

(3-12) Kháng thể được nhân hóa và kháng thể người

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa hoặc mảnh liên kết của nó.

Tốt hơn là, kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

Ví dụ được ưu tiên về kháng thể được nhân hóa theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể được nhân hóa có chuỗi nặng CDRH1 đến CDRH3 và chuỗi nhẹ CDRL1 đến CDRL3 của rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, hoặc rLA1264, như được mô tả sau đây trong mục A đến E.

(A. Kháng thể được nhân hóa có chuỗi nặng CDRH1 đến CDRH3 và chuỗi nhẹ CDRL1 đến CDRL3 của kháng thể rLA204)

Ví dụ về kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể được nhân hóa mà bao gồm chuỗi nặng có vùng biến đổi chứa CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 41 (Fig. 56), CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 42 (Fig. 57), và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 43 (Fig. 58), và chuỗi nhẹ có vùng biến đổi chứa CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 44 (Fig. 59), CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 45 (Fig. 60), và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 46 (Fig. 61), và nhận dạng protein LAG-3 theo sáng chế, mảnh liên kết của nó, hoặc thể đột biến của nó.

(B. Kháng thể được nhân hóa có chuỗi nặng CDRH1 đến CDRH3 và chuỗi nhẹ CDRL1 đến CDRL3 của kháng thể rLA212)

Ví dụ khác về kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hoặc mảnh liên kết của nó có thể bao gồm kháng thể được nhân hóa mà bao gồm chuỗi nặng có vùng biến đổi chứa CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 47 (Fig. 62), CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 48 (Fig. 63), và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 49 (Fig. 64), và

chuỗi nhẹ có vùng biến đổi chứa CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 50 (Fig. 65), CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 51 (Fig. 66), và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 52 (Fig. 67), và nhận dạng protein LAG-3 theo sáng chế, mảnh liên kết của nó, hoặc thể đột biến của nó.

(C. Kháng thể được nhân hóa có chuỗi nặng CDRH1 đến CDRH3 và chuỗi nhẹ CDRL1 đến CDRL3 của kháng thể rLA225)

Ví dụ khác về kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hoặc mảnh liên kết của nó có thể bao gồm kháng thể được nhân hóa mà bao gồm chuỗi nặng có vùng biến đổi chứa CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 53 (Fig. 68), CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 54 (Fig. 69), và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 55 (Fig. 70), và chuỗi nhẹ có vùng biến đổi chứa CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 56 (Fig. 71), CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 57 (Fig. 72), và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 58 (Fig. 73), và nhận dạng protein LAG-3 theo sáng chế, mảnh liên kết của nó, hoặc thể đột biến của nó.

(D. Kháng thể được nhân hóa có chuỗi nặng CDRH1 đến CDRH3 và chuỗi nhẹ CDRL1 đến CDRL3 của kháng thể rLA869)

Ví dụ khác về kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hoặc mảnh liên kết của nó có thể bao gồm kháng thể được nhân hóa mà bao gồm chuỗi nặng có vùng biến đổi chứa CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 59 (Fig. 74), CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 60 (Fig. 75), và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 61 (Fig. 76), và chuỗi nhẹ có vùng biến đổi chứa CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 62 (Fig. 77), CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 63 (Fig. 78), và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 64 (Fig. 79), và nhận dạng protein LAG-3 theo sáng chế, mảnh liên kết của nó, hoặc thể đột biến của nó.

(E. Kháng thể được nhân hóa có chuỗi nặng CDRH1 đến CDRH3 và chuỗi nhẹ CDRL1 đến CDRL3 của kháng thể rLA1264)

Ví dụ khác về kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa hoặc mảnh liên kết của nó có thể bao gồm kháng thể được nhân hóa mà bao gồm chuỗi nặng có vùng biến đổi chứa CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 65 (Fig. 80), CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 66 (Fig. 81), và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 67 (Fig. 82), và chuỗi nhẹ có vùng biến đổi chứa CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 68 (Fig. 83), CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 69 (Fig. 84), và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 70 (Fig. 85), và nhận dạng protein LAG-3 theo sáng chế, mảnh liên kết của nó, hoặc thể đột biến của nó.

Ví dụ được ưu tiên về kháng thể được nhân hóa theo sáng chế bao gồm các kháng thể được mô tả trong mục A đến E trên đây. Ví dụ được ưu tiên hơn về kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5, hLA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5, và hLA212_H4/L2 (xem [i] đến [x] sau đây). Ví dụ được ưu tiên hơn về kháng thể được nhân hóa theo sáng chế cũng bao gồm kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của bất kỳ một trong số các kháng thể được nhân hóa hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5, hLA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5, và hLA212_H4/L2, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của bất kỳ một trong số các kháng thể được nhân hóa hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5, hLA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5, và hLA212_H4/L2.

[i]

[i-1] hLA212_H3/L2 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 29 (Fig. 44) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 33 (Fig. 48) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình

tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 34 (Fig. 49) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3), đặc tính được mô tả trong (3-8), cụ thể là, sự có mặt của kháng thể cho phép LAG-3 ở người tạo ra chức năng ức chế tế bào T ở người (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-7).

[i-2] hLA212_H4/L2 là kháng thể được nhân hóa mà thu được trong Ví dụ 8 và sự biến đổi mạch đường của nó được điều chỉnh, và là dạng fucoza thấp đối với hLA212_H3/L2. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 29 (Fig. 44) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 33 (Fig. 48) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 34 (Fig. 49) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3, hoạt tính ADCC in vitro, hoạt tính làm giảm lượng tế bào dương tính với LAG-3 in vivo, và hoạt tính ức chế viêm não tủy tự miễn thử nghiệm in vivo được mô tả trong (3-2) đến (3-5) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), mà có hoạt tính liên kết tế bào T được hoạt hóa ở người được mô tả trong (3-6), và có các đặc tính được mô tả trong (3-7) và (3-8), cụ thể là, sự có mặt của kháng thể cho phép LAG-3 ở người ức chế hoạt tính cụ thể của nó.

[ii] hLA212_H2/L1 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 27 (Fig. 42) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của

nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 31 (Fig. 46) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 32 (Fig. 47) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

[iii] hLA212_H3/L3 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 29 (Fig. 44) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 35 (Fig. 50) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 36 (Fig. 51) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

[iv] hLA212_H2/L2 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 27 (Fig. 42) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61

đến 702 của SEQ ID No: 33 (Fig. 48) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 34 (Fig. 49) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

[v] hLA212_H2/L3 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 27 (Fig. 42) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 35 (Fig. 50) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 36 (Fig. 51) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

[vi] hLA212_H2/L4 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 27 (Fig. 42) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 37 (Fig. 52) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 38 (Fig. 53)

(trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

[vii] hLA212_H2/L5 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 27 (Fig. 42) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 (Fig. 43) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 39 (Fig. 54) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 40 (Fig. 55) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

[viii] hLA212_H3/L1 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 29 (Fig. 44) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 31 (Fig. 46) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 32 (Fig. 47) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà

thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

[ix] hLA212_H3/L4 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 29 (Fig. 44) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 37 (Fig. 52) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 38 (Fig. 53) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có hoạt tính liên kết LAG-3 và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

[x] hLA212_H3/L5 là kháng thể được nhân hóa thu được trong Ví dụ 6. Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể này chứa nucleotit vị trí 58 đến 1410 của SEQ ID No: 29 (Fig. 44) (trong đó vùng biến đổi là 58 đến 420), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 (Fig. 45) (trong đó vùng biến đổi là 20 đến 140). Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của nó chứa nucleotit vị trí 61 đến 702 của SEQ ID No: 39 (Fig. 54) (trong đó vùng biến đổi là 61 đến 387), và trình tự axit amin của nó chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 40 (Fig. 55) (trong đó vùng biến đổi là 21 đến 129). Nó có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế mà là kháng thể có các đặc tính vật lý mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế (dữ liệu không được thể hiện), mà có

LAG3-hoạt tính liên kết và hoạt tính ADCC in vitro được mô tả trong (3-2) và (3-3) (xem Ví dụ thực hiện sáng chế), và có hoạt tính, các đặc tính, v.v., được mô tả trong (3-4) đến (3-8).

Trong [i] đến [x] trên đây, hoạt tính được mô tả trong (3-4) và (3-5) có thể là tốt hơn được đánh giá ở dạng fucoza thấp. Thuật ngữ "các đặc tính vật lý" trong bản mô tả này nghĩa là độ ổn định của kháng thể và mảnh liên kết của nó theo sáng chế như thể vật lý, mà có thể được đánh giá bằng cách sử dụng chỉ số đã biết. Ví dụ về độ ổn định như thể vật lý có thể bao gồm độ ổn định nhiệt và độ ổn định lưu trữ, và ví dụ về chỉ số của chúng có thể bao gồm giá trị Tm thu được từ nhiệt độ và sự thay đổi về hoạt tính liên kết kháng nguyên dưới điều kiện lưu trữ hoặc sđiều kiện thoái biến gia tăng hoặc sự thay đổi theo thời gian.

Ngoài ra, kháng thể hLA212_H4/L2 được sử dụng cho chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người của Ví dụ 10 trong liều đơn, kết quả là, sự giảm thể trọng và vấn đề về độc tính đáng kể khác không quan sát được. Do đó, kháng thể được nhân hóa theo sáng chế có độ an toàn thích hợp đối với phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh liên quan đối với tế bào dương tính với LAG-3 (như được xác định trong bản mô tả này), việc sử dụng đối với việc điều trị hoặc ngăn ngừa này, được phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v. Trong số các ví dụ được ưu tiên hơn về kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa và mảnh liên kết của nó theo sáng chế được mô tả trên đây, hLA212_H3/L2, hLA212_H2/L1, hLA212_H3/L3, hLA212_H3/L6, và hLA212_H4/L2 được ưu tiên hơn nữa.

HLA212_H2/L1 đến H2/L5, hLA212_H3/L1 đến H3/L5, hLA212_H4/L2, v.v., nằm trong khoảng được ưu tiên hơn nữa của kháng thể kháng LAG-3 được nhân hóa theo sáng chế có thể chứa chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin trong đó 1 đến một vài, tốt hơn là 1 hoặc 2 axit amin được thế bằng axit amin khác trong FRH1 đến FRH4 của trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin trong đó 1 hoặc nhiều, tốt hơn là số lượng bất kỳ axit amin được chọn từ 1 đến 14 được thế bằng axit amin khác trong FRL1 đến FRL4 của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ.

Tốt hơn nữa là, trong chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa, axit amin 1 của FRL1, cụ thể là, axit amin 1 trong vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng

với vị trí 21 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Asp hoặc Asn, axit amin 11 của FRL1, cụ thể là, axit amin 11 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 31 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Leu hoặc Met, axit amin 13 của FRL1, cụ thể là, axit amin 13 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 33 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Ala hoặc Ile, axit amin 21 của FRL1, cụ thể là, axit amin 21 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 41 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Ile hoặc Met, axit amin 4 của FRL2, cụ thể là, axit amin 38 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 58 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Gln hoặc Lys, axit amin 9 của FRL2, cụ thể là, axit amin 43 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 63 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Ala hoặc Ser, axit amin 4 của FRL3, cụ thể là, axit amin 60 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 80 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Ser hoặc Asp, axit amin 9 của FRL3, cụ thể là, axit amin 65 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 85 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Ser hoặc Gly, axit amin 11 của FRL3, cụ thể là, axit amin 67 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 87 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Ser hoặc Tyr, axit amin 22 của FRL3, cụ thể là, axit amin 78 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 98 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Leu hoặc Val, axit amin 27 của FRL3, cụ thể là, axit amin 83 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 103 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Phe hoặc Ala, axit amin 29 của FRL3, cụ thể là, axit amin 85 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 105 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Thr hoặc Phe, axit amin 7 của FRL4, cụ thể là, axit amin 104 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 124 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Val hoặc Leu, và axit amin 9 của FRL4, cụ thể là, axit amin 106 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 126 của SEQ ID No: 32 hoặc Fig. 47) là Ile hoặc Leu.

Tốt hơn nữa là, trong chuỗi nặng của kháng thể được nhân hóa, axit amin 14 của FRH2, cụ thể là, axit amin 49 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 68 của SEQ ID No: 28 hoặc Fig. 43) là Gly hoặc Ala, và axit amin 25 của

FRH3, cụ thể là, axit amin 84 của vùng biến đổi trưởng thành (axit amin tương ứng với vị trí 103 của SEQ ID No: 28 hoặc Fig. 43) là Asn hoặc Asp.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể mà chứa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có 80% hoặc cao hơn, 82% hoặc cao hơn, 84% hoặc cao hơn, 86% hoặc cao hơn, 88% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 92% hoặc cao hơn, 94% hoặc cao hơn, 96% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn tương đồng với trình tự axit amin có chiều dài hoàn chỉnh hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của bất kỳ một trong số các kháng thể rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, rLA1264, cLA204, cLA212, cLA225, cLA869, và cLA1264, và kháng thể hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5, hLA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5, và hLA212_H4/L2 được nhân hóa theo sáng chế, và liên kết với LAG-3, hoặc mảnh liên kết của nó. Độ tương đồng về trình tự này tốt hơn là 94% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 96% hoặc cao hơn, ngoài ra tốt hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, tối ưu là 99% hoặc cao hơn. Ngoài ra, kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

Độ tương đồng hoặc tính tương đồng giữa hai loại trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thông số chuẩn của chương trình Blast algorithm version 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Chương trình Blast algorithm cũng đã sẵn có, ví dụ, bằng cách truy cập Internet tại <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể mà chứa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin mà được tạo ra từ trình tự axit amin vùng biến đổi hoặc có chiều dài hoàn chỉnh của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của bất kỳ một trong số các kháng thể

rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, rLA1264, cLA204, cLA212, cLA225, cLA869, và cLA1264, và hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5, hLA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5 và kháng thể hLA212_H4/L2 theo sáng chế bằng cách thế, loại bỏ, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 50, 1 đến 45, 1 đến 40, 1 đến 35, 1 đến 30, 1 đến 25, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 axit amin, và liên kết với LAG-3, hoặc mảnh liên kết của nó. Sự đột biến axit amin này tốt hơn là thế. Các axit amin được đột biến tốt hơn là 1 đến 5, tốt hơn nữa là 1 đến 4, thậm chí tốt hơn nữa là 1 đến 3, ngoài ra tốt hơn nữa là 1 hoặc 2, tốt nhất là 1. Ngoài ra, kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

Sáng chế còn bao gồm kháng thể mà chứa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được mã hóa bằng trình tự nucleotit của nucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với nucleotit có trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin vùng biến đổi hoặc có chiều dài hoàn chỉnh của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của bất kỳ một trong số các kháng thể rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, rLA1264, cLA204, cLA212, cLA225, cLA869 và cLA1264, và hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5, hLA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5, và kháng thể hLA212_H4/L2 theo sáng chế, và liên kết với LAG-3, hoặc mảnh liên kết của nó. Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể người hoặc mảnh liên kết của nó. Kháng thể người hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là nó là kháng thể có nguồn gốc từ người mà liên kết với LAG-3 hoặc mảnh liên kết của nó, nhưng có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4), (3-5), (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

(3-13) Kháng thể liên kết với epitop

"Kháng thể liên kết với cùng một vị trí" như trong trường hợp kháng thể được đề xuất theo sáng chế cũng nằm trong kháng thể theo sáng chế. "Kháng thể liên kết với cùng một vị trí" làm kháng thể cụ thể nghĩa là các kháng thể khác nhau mà liên kết với một vị trí trên phân tử kháng nguyên được nhận dạng bởi kháng thể. Nếu kháng thể thứ hai liên kết với một phần peptit hoặc một phần cấu trúc ba chiều trên phân tử kháng nguyên được liên kết bằng kháng thể thứ nhất, kháng thể thứ nhất và thứ hai được xác định là liên kết với cùng một vị trí. Theo một phương án khác, kháng thể thứ nhất và thứ hai được xác định là liên kết với cùng vị trí bằng cách xác định rằng kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết với kháng nguyên, cụ thể là, kháng thể thứ hai cản trở liên kết của kháng thể thứ nhất đối kháng nguyên, thậm chí nếu trình tự peptit hoặc cấu trúc ba chiều của vị trí liên kết đặc hiệu không được xác định. Khi kháng thể thứ nhất và thứ hai liên kết với cùng một vị trí, và kháng thể thứ nhất có ảnh hưởng đặc tính của một khía cạnh về kháng thể theo sáng chế, như sự có mặt của nó cho phép LAG-3 tạo ra chức năng ức chế tế bào T, kháng thể thứ hai cũng có khả năng rất cao có cùng hoạt tính. Do đó, nếu kháng thể thứ hai kháng LAG-3 liên kết với vị trí được liên kết bằng kháng thể thứ nhất kháng LAG-3, kháng thể thứ nhất và thứ hai được xác định là liên kết với cùng vị trí trên protein LAG-3. Theo một phương án khác, kháng thể thứ nhất và thứ hai kháng LAG-3 được xác định là liên kết

với cùng vị trí trên protein LAG-3 bằng cách xác định rằng kháng thể thứ hai kháng LAG-3 cạnh tranh với kháng thể thứ nhất kháng LAG-3 để liên kết với protein LAG-3.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể liên kết với vị trí trên protein LAG-3 được nhận dạng bởi kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Kháng thể và mảnh liên kết của nó có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là (3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8).

Kháng thể liên kết vị trí có thể được xác định bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như thử nghiệm miễn dịch. Ví dụ, các peptit được điều chế bằng các phân cắt liên tục một cách thích hợp trình tự axit amin của kháng nguyên từ đầu cuối C hoặc đầu cuối N của nó, và hoạt tính của kháng thể được nghiên cứu để xác định vị trí nhận dạng. Sau đó, peptit ngắn hơn được tổng hợp, và hoạt tính của kháng thể đối với peptit này có thể được nghiên cứu nhờ đó để xác vị trí định liên kết. Peptit mảnh kháng nguyên có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật như tái tổ hợp gen hoặc tổng hợp peptit.

Khi kháng thể liên kết với hoặc nhận dạng một phần hình dạng của kháng nguyên, liên kết vị trí đối với kháng thể có thể được xác định bằng cách xác định gốc axit amin trên kháng nguyên liền kề với kháng thể bằng cách sử dụng phân tích cấu trúc tia X. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó và kháng nguyên hoặc mảnh của nó có thể được liên kết với nhau và được kết tinh, sau đó bằng cách phân tích cấu trúc để xác định mỗi gốc axit amin trên kháng nguyên có khoảng cách tương tác với kháng thể này. Khoảng cách tương tác là 8 angstrom hoặc ngắn hơn, tốt hơn là 6 angstrom hoặc ngắn hơn, tốt hơn nữa là 4 angstrom hoặc ngắn hơn. Một hoặc nhiều gốc axit amin này có khoảng cách tương tác với kháng thể có thể cấu thành vị trí (epitop) trên kháng nguyên trong đó kháng thể liên kết. Hai hoặc nhiều gốc axit amin này có thể không liền kề với nhau trên trình tự ban đầu.

Epitop của kháng thể theo sáng chế có mặt trong LAG-3 ở người hoặc trình tự axit amin của nó. Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, hoặc dạng được biến đổi của nó còn bao gồm kháng thể liên kết với epitop này, mà cạnh tranh với kháng thể theo sáng chế để liên kết với epitop, hoặc có khoảng cách tương tác với các gốc axit amin này, mảnh liên kết của nó, hoặc dạng được biến đổi của nó.

(3-14) Dạng được biến đổi của kháng thể

Sáng chế đề xuất dạng được biến đổi của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó. Dạng được biến đổi của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế được tạo ra bằng sự biến đổi hóa học hoặc sinh học. Sự biến đổi hóa học bao gồm, ví dụ, dạng có khung axit amin được liên hợp với gốc hóa học, và dạng có mạch hydrat cacbon liên kết với N hoặc liên kết với O được biến đổi hóa học. Dạng được biến đổi sinh học bao gồm, ví dụ, dạng mà được biến đổi sau dịch mã (ví dụ, sự glycosyl hóa liên kết với N hoặc liên kết với O, xử lý đầu cuối N hoặc đầu cuối C, deamid hóa, isome hóa của axit aspartic, hoặc oxy hóa của methionin), và dạng bao gồm gốc methionin được bổ sung vào đầu cuối N bằng sự biểu hiện bằng cách sử dụng tế bào vật chủ không nhân. Dạng được biến đổi này cũng có nghĩa bao gồm dạng được đánh dấu để thực hiện quá trình phát hiện hoặc quá trình phân lập của kháng thể hoặc kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ, dạng được đánh dấu bằng enzym, dạng được đánh dấu bằng huỳnh quang, hoặc dạng được đánh dấu bằng ái lực. Dạng được biến đổi này của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế hữu dụng đối với sự cải thiện về độ ổn định hoặc sự duy trì trong máu của kháng thể ban đầu theo sáng chế hoặc mảnh liên kết ban đầu của nó, sự giảm về tính kháng nguyên, quá trình phát hiện hoặc quá trình phân lập của kháng thể hoặc kháng nguyên, v.v.

Ví dụ về gốc hóa học trong sự biến đổi hóa học có thể bao gồm polyme có thể tan trong nước như polyetylen glycol, etylen glycol/propylen glycol copolyme, cacboxymetylxenluloza, dextran, và rượu polyvinyllic.

Ví dụ về dạng được biến đổi sinh học có thể bao gồm dạng được biến đổi bằng cách xử lý bằng enzym, xử lý bằng tế bào, hoặc tương tự, dạng được dung hợp với peptit khác, như chất đánh dấu, được bổ sung bằng cách tái tổ hợp gen, và dạng được

điều chế từ tế bào vật chủ biểu hiện enzym biến đổi mạch đường nội sinh hoặc ngoại sinh.

Hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể của kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế có thể được nâng cao bằng cách điều chỉnh sự biến đổi (sự glycosyl hóa, defucosyl hóa, v.v.) của mạch đường được liên kết với kháng thể hoặc mảnh liên kết. Ví dụ, phương pháp được mô tả trong WO99/54342, WO00/61739, và WO02/31140 đã biết làm kỹ thuật điều hòa sự biến đổi mạch đường này của kháng thể, mặc dù kỹ thuật này không bị giới hạn chỉ ở đó. Dạng được biến đổi của kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm kháng thể mà được biến đổi mạch đường do đó được điều chỉnh.

Sự biến đổi này có thể được thực hiện ở vị trí tùy ý hoặc vị trí mong muốn trong kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó. Một hoặc hai hoặc nhiều sự biến đổi khác nhau có thể được thực hiện ở một hoặc hai hoặc nhiều vị trí trên đó.

Trong bản mô tả này, "dạng được biến đổi của mảnh kháng thể" cũng có nghĩa bao gồm "mảnh của dạng được biến đổi của kháng thể".

Trong bản mô tả này, dạng được biến đổi của kháng thể hoặc dạng được biến đổi của mảnh liên kết của nó cũng được gọi đơn giản là "kháng thể" hoặc "mảnh liên kết của kháng thể".

Như được mô tả trên đây, hLA212_H4/L2 là kháng thể được nhân hóa mà thu được trong Ví dụ 8 và sự biến đổi mạch đường của nó được điều chỉnh. Kháng thể được nhân hóa cũng nằm trong định nghĩa của kháng thể theo sáng chế.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, và dạng được biến đổi của nó như được mô tả trên đây tốt hơn là có các đặc tính vật lý, dược động học, sự duy trì trong máu, độ an toàn, v.v., mà thích hợp đối với dược phẩm, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa, việc sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa, v.v., theo sáng chế.

4. Phương pháp sản xuất kháng thể

(4-1) Phương pháp bằng cách sử dụng tế bào lai

Kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế có thể được điều chế theo phương pháp của Kohler và Milstein (Kohler and Milstein, *Nature* (1975), 256, p. 495-497; và Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)). Do

đó, tế bào sản xuất kháng thể kháng LAG-3 được phân lập từ lá lách của động vật được tạo miễn dịch với protein LAG-3 hoặc dạng hòa tan của nó và tế bào được dung hợp với tế bào u tủy nhờ đó để tạo ra tế bào lai. Kháng thể đơn dòng có thể thu được từ môi trường nuôi cấy các tế bào lai này.

(4-1-1) Quá trình điều chế kháng nguyên

Kháng nguyên đối với quá trình điều chế kháng thể kháng LAG-3 có thể thu được theo, ví dụ, phương pháp điều chế protein tái tổ hợp LAG-3 hoặc bằm sinh được mô tả trong các đoạn khác nhau theo sáng chế. Do đó, ví dụ về kháng nguyên mà có thể được điều chế có thể bao gồm protein LAG-3, mảnh protein LAG-3 chứa một phần trình tự với ít nhất 6 axit amin liên tiếp của protein LAG-3, và dẫn xuất của chúng còn chứa trình tự axit amin tùy ý hoặc chất mang được bổ sung vào đó (sau đây, còn được gọi là "Kháng nguyên LAG-3").

Kháng nguyên LAG-3 tái tổ hợp có thể được điều chế bằng cách truyền nhiễm tế bào vật chủ với gen chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của kháng nguyên LAG-3, và thu hồi kháng nguyên từ môi trường nuôi cấy tế bào. Kháng nguyên tái tổ hợp này có thể là protein dung hợp với protein khác như vùng Fc globulin miễn dịch. Kháng nguyên LAG-3 thu được trong quá hệ dịch mã *in vitro* không chứa tế bào từ gen chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của kháng nguyên LAG-3 cũng nằm trong kháng nguyên LAG-3 tái tổ hợp. Kháng nguyên LAG-3 không tái tổ hợp có thể được tinh chế và được phân lập từ tế bào biểu hiện LAG-3 hoặc tương tự.

Để thu được kháng thể đơn dòng kháng LAG-3 mà sự có mặt của nó cho phép LAG-3 tạo ra chức năng ức chế tế bào T hoặc không kìm hãm hoặc ức chế chức năng ức chế tế bào T của LAG-3, thể đột biến LAG-3 trong đó vùng giống globulin miễn dịch 1 và 2 được loại bỏ, ví dụ, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thể hữu dụng làm chất sinh miễn dịch được ưu tiên.

(4-1-2) Quá trình sản xuất kháng thể đơn dòng kháng LAG-3

Kháng thể đơn dòng thường được tạo ra thông qua các bước sau đây:

- (a) điều chế kháng nguyên,
- (b) điều chế tế bào sản xuất kháng thể,

- (c) điều chế tế bào u tủy (sau đây, được gọi là "u tủy"),
- (d) dung hợp tế bào sản xuất kháng thể với u tủy,
- (e) sàng lọc đối với nhóm tế bào lai sản xuất kháng thể liên quan, và
- (f) thu dòng tế bào duy nhất (đơn dòng).

Phương pháp sản xuất này còn bao gồm bước (g) nuôi cấy tế bào lai, phát triển động vật được cấy ghép tế bào lai, v.v., và (h) thử nghiệm hoặc xác định hoạt tính sinh học của kháng thể đơn dòng, v.v., nếu cần.

Sau đây, phương pháp điều chế kháng thể đơn dòng sẽ được mô tả chi tiết liên quan đến các bước này. Tuy nhiên phương pháp điều chế kháng thể không chỉ giới hạn ở các bước này, và tế bào sản xuất kháng thể khác với tế bào lá lách, ví dụ, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thể hữu dụng.

(a) Quá trình tinh chế của kháng nguyên

Bước này được thực hiện theo phương pháp điều chế protein LAG-3 được mô tả trên đây trong (2-3).

(b) Bước điều chế tế bào sản xuất kháng thể

Kháng nguyên thu được trong bước (a) được trộn với tá chất như tá chất Freund hoàn chỉnh hoặc không hoàn chỉnh hoặc kali nhôm sulfat, và động vật thí nghiệm được tạo miễn dịch với chất sinh miễn dịch thu được. Động vật thí nghiệm bất kỳ được sử dụng trong phương pháp điều chế tế bào lai đã biết trong lĩnh vực này có thể hữu dụng mà không bị giới hạn. Cụ thể là, ví dụ, chuột, chuột nhắt, dê, cừu, trâu bò, hoặc ngựa có thể hữu dụng. Xét từ quan điểm về sự sẵn có tế bào u tủy để được dung hợp với tế bào sản xuất kháng thể được phân lập, v.v., động vật được tạo miễn dịch tốt hơn là chuột hoặc chuột nhắt.

Chủng chuột hoặc chuột nhắt trên thực tế được sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể. Trong trường hợp chuột, ví dụ, A, AKR, BALB/c, BALB/cAnNCrj, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, hoặc 129 có thể hữu dụng. Trong trường hợp chuột nhắt, ví dụ, chuột Wistar, Low, Lewis, Sprague-Dawley, ACI, BN, hoặc Fischer có thể hữu dụng.

Chuột và chuột nhắt này là có sẵn từ người gây giống động vật thí nghiệm hoặc nhà phân phối, ví dụ, CLEA Japan, Inc. hoặc Charles River Laboratories Japan Inc.

Trong số chuột và chuột nhắt, chủng chuột BALB/c hoặc Wistar và chủng chuột Low đặc biệt được ưu tiên làm động vật được tạo miễn dịch xét về khả năng phù hợp trong dung hợp với tế bào u tùy sẽ được mô tả sau đây.

Ngoài ra, xét về tính tương đồng giữa kháng nguyên người và chuột, chuột mà cơ chế sinh học để loại bỏ thể tự kháng đã được làm giảm, cụ thể là, chuột mắc bệnh tự miễn, tốt hơn là được sử dụng.

Trong nghĩa cảnh này, chuột hoặc chuột nhắt này tốt hơn là 5 đến 12 tuần tuổi, tốt hơn nữa là 6 đến 8 tuần tuổi, ở thời điểm tạo miễn dịch.

Động vật có thể được tạo miễn dịch với protein LAG-3 bằng cách sử dụng, ví dụ, phương pháp của Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964).

Ví dụ về phương pháp để xác hàm lượng định kháng thể có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm miễn dịch như RIA và ELISA.

Tế bào sản xuất kháng thể được tạo ra từ tế bào lá lách hoặc tế bào lympho được phân lập từ được tạo miễn dịch động vật, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thể được điều chế theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, Kohler et al., Nature (1975) 256, p.495,; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977) 6, p.511,; Milstein et al., Nature (1977), 266, p.550,; Walsh, Nature, (1977) 266, p.495.

Trong trường hợp tế bào lá lách, phương pháp chung có thể được sử dụng, mà bao gồm bước băm lá lách, lọc tế bào thông qua mắt lưới không gỉ, và sau đó phân tán tế bào thu được trong môi trường thiết yếu tối thiểu của Eagle (minimum essential medium - MEM) hoặc tương tự, để phân lập tế bào sản xuất kháng thể.

(c) Bước điều chế u tùy

Tế bào u tùy được sử dụng trong dung hợp tế bào không bị giới hạn một cách cụ thể và có thể được chọn thích hợp để sử dụng từ dòng tế bào đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, dòng thiếu hụt hypoxanthin-guanin phosphoribosyl transferaza (hypoxanthine-guanin phosphoribosyl transferaza - HGPRT), cụ thể là, X63-Ag8 (X63), NS1-ANS/1 (NS1), P3X63-Ag8.U1 (P3U1), X63-Ag8.653 (X63.653), SP2/0-Ag14 (SP2/0),

MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG), FO, S149/5XXO có nguồn gốc từ chuột nhắt, hoặc BU.1, 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3) có nguồn gốc từ chuột, hoặc U266AR (SKO-007), GM1500-GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2) nguồn gốc từ người, hoặc 8226AR/NIP4-1 (NP41), và tương tự, mà quá trình sàng lọc đã được phát triển, tốt hơn được sử dụng xét về sự tiện lợi trong quá trình chọn của tế bào lai từ tế bào được dung hợp. Dòng thiếu hụt HGPRRT này là có sẵn từ, ví dụ, American Type Culture Collection (ATCC).

Dòng tế bào này cấy chuyển đầu tiên trong môi trường thích hợp, ví dụ, môi trường 8-azaguanin [Môi trường RPMI-1640 được bổ sung với glutamin, 2-mercaptoetanol, gentamicin, và huyết thanh thai bò (sau đây, được gọi là "FBS") và ngoài ra được bổ sung với 8-azaguanin], môi trường Dulbecco được biến đổi bởi Iscove (sau đây, được gọi là "IMDM"), hoặc môi trường Eagle được biến đổi bởi Dulbecco (sau đây, được gọi là "DMEM") và cấy chuyển đầu tiên trong môi trường bình thường [ví dụ, môi trường ASF104 (được sản xuất bởi Ajinomoto Co., Inc.) bao gồm 10% FBS] 3 đến 4 ngày trước khi dung hợp tế bào để đảm bảo rằng các tế bào bằng với hoặc lớn hơn 2×10^7 tế bào vào ngày dung hợp tế bào.

(d) Bước dung hợp tế bào sản xuất kháng thể với tế bào u tủy

Tế bào sản xuất kháng thể có thể được dung hợp với tế bào u tủy dưới điều kiện mà ngăn ngừa khả năng sống sót của tế bào từ không bị giảm một cách quá mức, theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), và Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964)). Ví dụ, phương pháp hóa học mà bao gồm bước trộn lẫn tế bào sản xuất kháng thể với tế bào u tủy trong dung dịch nồng độ cao của polyme như polyetylen glycol, hoặc phương pháp vật lý bằng cách sử dụng sự kích thích bằng điện có thể hữu dụng.

(e) Bước sàng lọc đối với nhóm tế bào lai sản xuất kháng thể liên quan

Phương pháp để sàng lọc của tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào không bị giới hạn một cách cụ thể, và phương pháp sàng lọc hypoxanthin-aminopterin-thymidin (hypoxanthine-aminopterin-thymidine - HAT) (Kohler et al., Nature (1975)

256, p.495; Milstein et al., Nature (1977) 266, p.550) thường được sử dụng. Phương pháp này hiệu quả đối với việc thu tế bào lai bằng cách sử dụng dòng tế bào u tủy thiếu hụt HGPRT, mà không thể sống sót với sự có mặt của aminopterin. Cụ thể là, tế bào không được dung hợp và tế bào lai có thể được nuôi cấy trong môi trường HAT để nhờ đó cho phép chỉ tế bào lai chống lại aminopterin để sống sót và phát triển một cách chọn lọc.

(f) Bước thu dòng tế bào duy nhất (đơn dòng)

Tế bào lai có thể được tạo dòng vô tính bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, methylxenuloza, agarosa mềm, hoặc phương pháp hòa tan giới hạn (xem ví dụ, Barbara, B.M. and Stanley, M.S.: Selectec Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Phương pháp hòa tan giới hạn được ưu tiên.

(g) Bước nuôi cấy tế bào lai và bước phát triển động vật được cấy ghép tế bào lai

Tế bào lai được chọn có thể được nuôi cấy để nhờ đó sản xuất kháng thể đơn dòng. Tốt hơn là, tế bào lai mong muốn được tạo dòng vô tính và sau đó được cho tham gia quá trình sản xuất kháng thể.

Kháng thể đơn dòng được tạo ra bằng cách này tế bào lai có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào lai. Ngoài ra, tái tổ hợp kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào được bổ sung vào với kháng thể đơn dòng gen. Theo một phương án khác, tế bào lai có thể được tiêm vào trong bụng chuột cùng chủng (ví dụ, BALB/cAnNCrj được mô tả trên đây) hoặc chuột Nu/Nu và để tự phát triển. Sau đó, kháng thể đơn dòng có thể được thu hồi từ báng bụng của chúng.

(h) Bước thử nghiệm hoặc xác định hoạt tính sinh học của kháng thể đơn dòng

Các thử nghiệm sinh học có thể được chọn và sử dụng cho mục đích này.

(4-2) phương pháp tạo miễn dịch tế bào

Tế bào biểu hiện protein LAG-3 bẩm sinh, tế bào biểu hiện protein tái tổ hợp LAG-3 hoặc mảnh của nó, hoặc tương tự, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thể hữu dụng làm chất sinh miễn dịch nhờ đó để điều chế kháng thể kháng LAG-3 bằng phương pháp tế bào lai được mô tả trên đây.

Tế bào biểu hiện LAG-3 này được sử dụng trong lượng 1×10^5 đến 1×10^9 tế bào, tốt hơn là 1×10^6 đến 1×10^8 tế bào, tốt hơn nữa là 0,5 đến 2×10^7 tế bào, thậm chí tốt hơn nữa là 1×10^7 tế bào, mỗi lần tạo miễn dịch. Các tế bào được sử dụng để tạo miễn dịch có thể được thay đổi theo mức biểu hiện của protein LAG-3. Chất sinh miễn dịch thường được sử dụng trong bụng và có thể được sử dụng thông qua đường trong da hoặc tương tự. Tế bào lai có thể được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong đoạn (4-1-2).

(4-3) tái tổ hợp gen

Để điều chế kháng thể theo sáng chế, nucleotit (nucleotit chuỗi nặng) chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng của nó và nucleotit (nucleotit chuỗi nhẹ) chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của nó, hoặc vector có sự chèn nucleotit chuỗi nặng và vector có sự chèn nucleotit chuỗi nhẹ được bổ sung vào trong tế bào vật chủ, và sau đó tế bào được nuôi cấy, và kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Nucleotit chuỗi nặng và nucleotit chuỗi nhẹ có thể được chèn trong một vector.

Tế bào không nhân hoặc nhân chuẩn có thể hữu dụng làm tế bào vật chủ. Trong trường hợp bằng cách sử dụng tế bào nhân chuẩn vật chủ, tế bào động vật, tế bào thực vật, hoặc vi sinh vật nhân chuẩn có thể hữu dụng.

Ví dụ về tế bào động vật có thể bao gồm tế bào từ động vật có vú, cụ thể là, tế bào COS từ khỉ (Gluzman, Y. Cell (1981), 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650), nguyên bào sợi NIH3T3 ở chuột (ATCC No. CRL-1658), dòng tế bào NS0 ở chuột (ECACC), tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO, ATCC CCL-61), dòng thiếu hụt dihydrofolat reductaza của nó ($\text{CHO}^{\text{dhfr-}}$; Urlaub, G. and Chasin, L.A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980), 77, p. 4126-4220), CHOK1SV (Lonza Biologics), tế bào được tạo ra từ chim như gà, và tế bào được tạo ra từ côn trùng.

Ngoài ra, tế bào được biến đổi để điều chỉnh sự biến đổi mạch đường của protein như kháng thể có thể hữu dụng làm vật chủ. Ví dụ, tế bào CHO được biến đổi này sao cho fucosa được liên kết với N-acetylglucosamin ở đầu được khử của mạch đường được làm khử trên hoặc được loại bỏ từ loại phức hợp mạch đường có liên kết N-glycosit với vùng Fc của kháng thể có thể hữu dụng trong sự biểu hiện kháng thể

nhờ đó dễ điều chế thấp fucoza hoặc kháng thể defucosyl hóa (còn được gọi là dạng được biến đổi của kháng thể) (WO00/61739, WO02/31140, v.v.).

Ví dụ về vi sinh vật nhân chuẩn có thể bao gồm men.

Ví dụ về tế bào không nhân có thể bao gồm *E. Coli* và *Bacillus subtilis*.

Peptit tín hiệu đối với sự tiết của kháng thể theo sáng chế (kháng thể đơn dòng được tạo ra từ động vật bất kỳ, kháng thể chuột nhắt, kháng thể chuột, kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa, kháng thể người, v.v.) không chỉ giới hạn ở tín hiệu gây tiết của kháng thể của cùng một loài, cùng loại, và cùng tiểu loại làm kháng thể theo sáng chế hoặc đối với kháng thể có tín hiệu gây tiết riêng theo sáng chế. Tín hiệu gây tiết bất kỳ của kháng thể của các oại hoặc tiểu loại khác nhau hoặc tín hiệu gây tiết bất kỳ của protein được tạo ra từ các loài nhân chuẩn khác nhau từ đó hoặc loài không nhân có thể được chọn và được sử dụng.

(4-4) Phương pháp thiết kế và điều chế kháng thể được nhân hóa

Ví dụ về kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể có nguồn gốc từ người có CDR được thay bằng CDR của kháng thể không từ người, động vật (xem Nature (1986), 321, p. 522-525), kháng thể người được ghép với trình tự CDR và bằng một số gốc axit amin của vùng bộ khung bằng cách ghép CDR (xem WO90/07861 và US6972323), và bất kỳ trong số các kháng thể được nhân hóa này trong đó một hoặc hai hoặc nhiều (các) axit amin có nguồn gốc từ kháng thể không từ người, động vật đã được thay bằng kháng thể nguồn gốc từ (các) axit amin người.

(4-5) Phương pháp điều chế kháng thể người

Ví dụ khác về kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể người. Kháng thể người kháng LAG-3 nghĩa là kháng thể kháng LAG-3 bao gồm trình tự axit amin của kháng thể có nguồn gốc từ người. Kháng thể người kháng LAG-3 có thể thu được bằng phương pháp bằng cách sử dụng chuột sản xuất kháng thể người mang mảnh ADN bộ gen người chứa gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể người (xem ví dụ, Tomizuka, K. et al., Nature genetics (1997) 16, p.133-143; Kuroiwa, Y. et. al., Nuc. Acids Res. (1998) 26, p.3447-3448; Yoshida, H. et. al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.),

Kluwer Academic Publishers, 1999.; và Tomizuka, K.et.al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p.722-727).

Cụ thể hơn, động vật sản xuất kháng thể người này có thể là bất kỳ trong số các động vật tái tổ hợp mà thu được bằng cách phá vỡ vị trí gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch nội sinh của động vật có vú không phải người và bổ sung vào đó vị trí gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch người thông qua vectơ nhiễm sắc thể nhân tạo từ men (YAC) hoặc tương tự, và các động vật tái tổ hợp mà được tạo ra bằng cách lai giống các động vật này.

Theo một phương án khác, tế bào nhân chuẩn có thể được chuyển nhiễm (được biến đổi) với cADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ một cách tương ứng, của kháng thể người này, tốt hơn là với vectơ chứa cADN, bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Tế bào được chuyển nhiễm (được biến đổi) sản xuất kháng thể người đơn dòng tái tổ hợp có thể được nuôi cấy. Kháng thể này có thể thu được từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy.

Trong nghĩa cảnh này, ví dụ, tế bào nhân chuẩn, tốt hơn là tế bào động vật có vú như tế bào CHO, tế bào lympho, hoặc u tủy, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thể hữu dụng làm vật chủ.

Ngoài ra, phương pháp để thu kháng thể người có nguồn gốc từ hiển thị trên thể thực khuẩn được chọn từ thư viện kháng thể người (xem ví dụ, Wormston, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p.2301-2308; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p.189-203; và Siriwardena, D.et.al., Ophthalmology (2002) 109 (3), p.427-431) là đã biết.

Ví dụ, phương pháp hiển thị trên thể thực khuẩn (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116) có thể hữu dụng, mà bao gồm việc cho phép vùng biến đổi của kháng thể người được biểu hiện làm kháng thể chuỗi đơn (scFv) trên bề mặt thể thực khuẩn và chọn lựa thể thực khuẩn liên kết với kháng nguyên.

Thể thực khuẩn được chọn trên cơ sở của khả năng liên kết của nó với kháng nguyên có thể được phân tích gen nhờ đó để xác định trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của kháng thể người liên kết với kháng nguyên.

Nếu trình tự ADN của scFv liên kết với kháng nguyên được xác định, thì sự biểu hiện vector có trình tự này có thể được điều chế và được bổ sung vào trong vật chủ thích hợp để cho phép chúng biểu hiện kháng thể người (WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388, Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p.433-455, và Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p.1105-1116).

(4-6) Phương pháp điều chế mảnh liên kết của kháng thể

Phương pháp điều chế kháng thể chuỗi đơn đã biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ, Patent Mỹ số US 4,946,778, 5,260,203, 5,091,513, và 5,455,030). Trong scFv này, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết thông qua chất liên kết mà ngăn chúng không tạo ra thể liên hợp, tốt hơn là chất liên kết polypeptit (Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988), 85, p. 5879-5883). Vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong scFv có thể được tạo ra từ cùng kháng thể hoặc có thể được tạo ra từ các kháng thể khác nhau.

Ví dụ, peptit mạch đơn tùy ý bao gồm 12 đến 19 gốc được sử dụng làm liên kết polypeptit mà liên kết các vùng biến đổi này.

Để thu được ADN mã hóa scFv, của trình tự của ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng của kháng thể và ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng của nó, mỗi phần ADN mã hóa toàn bộ trình tự hoặc axit amin mong muốn được sử dụng làm mẫu và được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi vòng qua cả hai đầu của mẫu. Sau đó, ADN mã hóa gốc liên kết polypeptit còn được khuếch đại kết hợp với cặp đoạn mỗi vòng qua cả hai đầu của ADN để thu được mảnh có thể được liên kết ở các đầu của nó đối với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ADN một cách tương ứng.

Do đó, ADN mã hóa scFv có thể hữu dụng để điều chế, theo phương pháp thông thường, vector biểu hiện bao gồm ADN và tế bào vật chủ được biến đổi với vector biểu hiện. Ngoài ra, tế bào vật chủ có thể còn được nuôi cấy, và scFv có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy theo phương pháp thông thường.

Cũng để thu được mảnh liên kết của kháng thể khác bất kỳ, gen mã hóa mảnh liên kết thu được theo phương pháp được mô tả trên đây và được bổ sung vào trong tế bào. Mảnh liên kết liên quan có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào.

Kháng thể theo sáng chế có thể được đa phân nhờ đó để làm tăng ái lực của nó đối với kháng nguyên. Trong trường hợp này, kháng thể của cùng loại có thể được đa phân, hoặc các kháng thể nhận dạng các epitop một cách tương ứng, của cùng kháng nguyên có thể được đa phân. Ví dụ về phương pháp để đa phân các kháng thể này có thể bao gồm liên kết của hai scFvs với vùng IgG CH3, liên kết của nó với streptavidin, và bổ sung mô tip xoắn-vòng-xoắn.

Kháng thể theo sáng chế có thể là hỗn hợp của các loại kháng thể kháng LAG-3 khác nhau về trình tự axit amin, cụ thể là, kháng thể đa dòng. Ví dụ về kháng thể đa dòng có thể bao gồm hỗn hợp của các loại kháng thể khác nhau về phần hoặc toàn bộ của CDR của chúng. Kháng thể đa dòng này có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào sản xuất kháng thể khác nhau được trộn lẫn để nuôi cấy (WO2004/061104). Theo một phương án khác, các kháng thể được điều chế riêng rẽ có thể được trộn. Huyết thanh miễn dịch, mà là một phương án của kháng thể đa dòng, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thể được điều chế bằng cách tạo miễn dịch động vật với kháng nguyên mong muốn và thu hồi huyết thanh từ động vật theo phương pháp chuẩn.

Kháng thể được liên hợp với các phân tử như polyetylen glycol (PEG) có thể cũng hữu dụng làm dạng được biến đổi của kháng thể theo sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế có thể còn là bất kỳ trong số các thể liên hợp được tạo thành bởi các kháng thể này với thuốc khác (thể liên hợp miễn dịch). Ví dụ về kháng thể này có thể bao gồm kháng thể được liên hợp với nguyên liệu phóng xạ hoặc hợp chất có tác dụng dược lý (Nature Biotechnology (2005), 23, p. 1137-1146).

Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, và dạng được biến đổi của nó như được minh họa hoặc được mô tả trong (3-11), (3-14), (4-6), v.v., còn được gọi là "kháng thể theo sáng chế hoặc phân tử chứa mảnh liên kết của nó".

(4-7) Quá trình tinh chế kháng thể

Kháng thể thu được có thể được tinh chế để đồng nhất. Quá trình tách protein thông thường và phương pháp tinh chế có thể hữu dụng đối với quá trình tinh chế và quá trình tinh chế của kháng thể.

Kháng thể có thể được tách riêng và được tinh chế bằng (các) phương pháp kết hợp hoặc được chọn thích hợp, ví dụ, cột sắc ký, lọc, lọc siêu, khử muối, thẩm tách,

điện di trên gel polyacrylamit điều chế, và/hoặc điện di tập trung đẳng điện (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); và Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lan, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) mặc dù quá trình tinh chế và phương pháp tinh chế không bị giới hạn chỉ ở đó.

Ví dụ về sắc ký bao gồm ái lực sắc ký, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký lọc gel, sắc ký đảo pha, và sắc ký hấp thụ.

Các phương pháp sắc ký này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng sắc ký pha lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Ví dụ về cột được sử dụng trong ái lực sắc ký có thể bao gồm cột protein A, protein G, và kháng nguyên.

Ví dụ về cột protein bao gồm Hyper D (được sản xuất bởi Pall Corp.), POROS (được sản xuất bởi Được sử dụng Biosystems, Inc.), và Sepharose F.F. (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-Sciences Corp.).

Ngoài ra, kháng thể có thể được tinh chế bằng cách sử dụng hoạt tính liên kết chống lại kháng nguyên của nó bằng cách sử dụng chất mang cố định kháng nguyên.

(4-8) Nucleotit mã hóa kháng thể, vector tái tổ hợp, và tế bào tái tổ hợp

Sáng chế cũng đề xuất nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, hoặc dạng được biến đổi của nó (sau đây, nucleotit này được gọi là "gen kháng thể"), vector tái tổ hợp có sự chèn gen, tế bào chứa gen hoặc vector (sau đây, tế bào này được gọi là "tế bào được chuyển nhiễm gen kháng thể"), và tế bào sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, hoặc dạng được biến đổi của nó (sau đây, tế bào này được gọi là "tế bào sản xuất kháng thể").

Tốt hơn là, gen kháng thể theo sáng chế chứa trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số các (a) đến (e) sau đây (sau đây, được gọi là "trình tự gen kháng thể"), bao gồm trình tự nucleotit chứa trình tự gen kháng thể, hoặc bao gồm trình tự gen kháng thể:

(a) dạng kết hợp của trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng của bất kỳ một trong số các kháng thể chuột rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264, kháng thể khảm của chúng cLA204, cLA212, cLA225, cLA869, và

cLA1264 trong đó vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể bằng vùng hằng định của kháng thể người, và kháng thể được nhân hóa của chúng hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5 và LA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5 và trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của nó;

(b) dạng kết hợp của trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng chứa CDRH1 đến CDRH3 của bất kỳ một trong số các kháng thể chuột rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264, kháng thể khảm của chúng cLA204, cLA212, cLA225, cLA869, và cLA1264 trong đó vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể bằng vùng hằng định của kháng thể người, và kháng thể được nhân hóa của chúng hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5 và LA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5 và trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ chứa CDRL1 đến CDRL3 của nó;

(c) dạng kết hợp của trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của bất kỳ một trong số các kháng thể chuột rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264, kháng thể khảm của chúng cLA204, cLA212, cLA225, cLA869, và cLA1264 trong đó vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể bằng vùng hằng định của kháng thể người, và kháng thể được nhân hóa của chúng hLA212_H2/L1 đến hLA212_H2/L5 và LA212_H3/L1 đến hLA212_H3/L5 và trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ;

(d) trình tự nucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với nucleotit bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (a) đến (c), và mã hóa trình tự axit amin của kháng thể liên kết với LAG-3; và

(e) trình tự nucleotit mà mã hóa trình tự axit amin được tạo ra từ trình tự axit amin theo mục bất kỳ trong số các mục từ (a) đến (c) bằng cách thế, loại bỏ, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 50, 1 đến 45, 1 đến 40, 1 đến 30, 1 đến 25, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 bazơ, và mã hóa trình tự axit amin của kháng thể liên kết với LAG-3, trong đó kháng thể có trình tự axit amin được mã hóa bằng trình tự nucleotit theo mục (d) hoặc (e) có các đặc tính, chức năng, hoạt tính, v.v., được mô tả trong (3-2), (3-3), và (3-8), tốt hơn là một hoặc nhiều trong số (3-4) đến (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tốt hơn nữa là

(3-4) và/hoặc (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, ngoài ra tốt hơn nữa là (3-4) và (3-5), và (3-6) và/hoặc (3-7) ngoài đặc tính, chức năng, hoạt tính trên đây, tối ưu là tất cả trong số các (3-2) đến (3-8), nhưng gen kháng thể theo sáng chế không chỉ giới hạn ở các (a) đến (e) được đề cập trên đây.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó, hoặc dạng được biến đổi của nó, bao gồm bước nuôi cấy tế bào được chuyển nhiễm gen kháng thể theo sáng chế và thu hồi kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó, hoặc dạng được biến đổi của nó từ môi trường nuôi cấy, như được mô tả trong (4-3). Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó, hoặc dạng được biến đổi của nó thu được bằng phương pháp này sản xuất này cũng nằm theo sáng chế.

5. Dược phẩm

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng LAG-3 hoặc mảnh liên kết của nó, hoặc dạng được biến đổi của nó.

Dược phẩm theo sáng chế hữu dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các các bệnh (mà sau đây còn được gọi là "các bệnh liên quan đối với tế bào dương tính với LAG-3") được khởi phát hoặc làm trầm trọng bằng tế bào T được hoạt hóa dương tính LAG-3, cụ thể là, tế bào T đáp ứng, tế bào T nhớ, hoặc tế bào T điều hòa, đặc biệt như các bệnh tự miễn, sự thải ghép, các bệnh dị ứng, u ác tính, và nhiễm trùng mạn tính.

Ví dụ về nguyên nhân gây ra đối với sự khởi phát hoặc sự làm trầm trọng của các bệnh này cần được điều trị hoặc ngăn ngừa có thể bao gồm các yếu tố gen và yếu tố môi trường (bao gồm dược phẩm, chế độ ăn kiêng, tia sáng, v.v.), hoặc được ảnh hưởng kết hợp của các yếu tố này.

Ví dụ về các bệnh này tự miễn có thể bao gồm viêm khớp dạng thấp, viêm cứng khớp đốt sống, luput ban đỏ toàn thân, bệnh xơ cứng bì, bệnh đa cơ, viêm da cơ, bệnh viêm cơ thể vùi, và viêm khớp tự phát bao gồm bệnh cơ hoại tử miễn dịch trung gian làm các bệnh tự miễn của mô liên kết/hệ cơ xương, thiếu máu không tái tạo và ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát làm các bệnh tự miễn của hệ máu, bệnh Crohn và viêm loét đại tràng làm các bệnh tự miễn của hệ tiêu hóa, đa xơ cứng và chứng nhược cơ năng làm các bệnh tự miễn của hệ thần kinh, viêm màng mạch nhỏ, viêm giác mạc,

và hội chứng Sjogren làm các bệnh tự miễn của hệ thị giác, bệnh Behcet và bệnh u hạt Wegener làm các bệnh tự miễn của hệ mạch, bệnh vẩy nến, bệnh pemfigut, hội chứng Stevens-Johnson, và bệnh đốm bạch tạng làm các bệnh tự miễn của hệ biểu bì, mạn tính bệnh phổi tắc nghẽn và bệnh phổi mô kẽ làm các bệnh tự miễn của hệ hô hấp, bệnh tiểu đường typ 1, viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh Graves, và viêm tuyến giáp Hashimoto làm các bệnh tự miễn của hệ nội tiết, và khác các bệnh tự miễn như viêm gan tự miễn và viêm thận do rối loạn miễn dịch, tốt hơn là các bệnh này với sự có mặt của tế bào dương tính với LAG-3 trong vị trí bệnh và/hoặc mô dạng bạch huyết.

Ví dụ về sự thải ghép có thể bao gồm sự thải ghép và phản ứng vật chủ chống lại sự ghép trong quá trình cấy ghép cơ quan như tim, thận, gan, tủy xương, và da hoặc mô của nó, và bệnh do vật chủ chống lại sự ghép gây ra bởi quá trình cấy ghép của tế bào tạo huyết trong tủy xương, máu ngoại vi, và máu dây rốn, v.v., tốt hơn là, này phản ứngs, triệu chứng, và các bệnh với sự có mặt của tế bào dương tính với LAG-3 trong vị trí và/hoặc mô dạng bạch huyết liên quan đến sự thải ghép.

Ví dụ về các bệnh dị ứng có thể bao gồm bệnh viêm da cơ địa, huyen suyễn, tính quá mẫn, phản ứng phản vệ, dị ứng thức ăn, viêm mũi, viêm tai giữa, phản ứng thuốc, phản ứng vết đốt côn trùng, phản ứng thực vật, dị ứng latex, viêm màng kết, chứng mày đay và viêm da tiếp xúc, tốt hơn là, các bệnh này với sự có mặt của tế bào dương tính với LAG-3 trong vị trí bệnh và/hoặc mô dạng bạch huyết.

Ví dụ về u ác tính có thể bao gồm ung thư vú, ung thư phổi, ung thư da (bao gồm ung thư u melanin), bệnh bạch cầu, u lympho, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u thần kinh đệm, ung thư gan, ung thư đại trực tràng, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tụy, ung thư thận, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư đầu và cổ, ung thư cổ tử cung, ung thư màng trong tử cung, ung thư buồng trứng, sarcoma xương, sarcoma mô mềm, và u mô đệm đường tiêu hóa, tốt hơn là, bệnh ung thư và u ác tính này với sự có mặt của tế bào dương tính với LAG-3.

Ví dụ về nhiễm trùng mạn tính có thể bao gồm nhiễm trùng bằng vi khuẩn, virus, nấm, và vi sinh vật khác, tốt hơn là, các bệnh này với sự có mặt của tế bào dương tính với LAG-3.

Trong bản mô tả này, điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngăn ngừa sự khởi phát của bệnh, tốt hơn là bệnh ở cá thể biểu hiện protein LAG-3, ngăn ngừa hoặc ức chế của sự làm trầm trọng hoặc sự tiến triển của nó, làm thuyên giảm của một hoặc hai hoặc nhiều triệu chứng bệnh được biểu hiện bởi cá thể bị mắc bệnh, ngăn ngừa hoặc giảm sự làm trầm trọng hoặc sự tiến triển của nó, điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh thứ phát, v.v.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa lượng hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa kháng thể kháng LAG-3 hoặc mảnh liên kết của kháng thể, và được dụng chất pha loãng, chất dẫn (chất mang), chất làm tan, chất nhũ hóa, chất bảo quản, và/hoặc chất phụ gia.

"Lượng hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa" nghĩa là lượng mà tạo ra tác dụng điều trị hoặc ngăn ngừa trên bệnh cụ thể bằng dạng liều cụ thể và đường sử dụng và có cùng nghĩa như "lượng hiệu quả dược lý".

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa nguyên liệu để thay đổi, duy trì, hoặc giữ nguyên pH, áp lực thẩm thấu, độ nhớt, độ trong suốt, màu sắc, tính đẳng trương, độ vô trùng, hoặc độ ổn định, độ tan, giải phóng kéo dài, độ hấp thụ, độ thấm, dạng liều, độ bền, các đặc tính, hình dạng, v.v., của chế phẩm hoặc kháng thể được chứa trong đó (sau đây, được gọi là "nguyên liệu dược phẩm"). Nguyên liệu dược phẩm không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nguyên liệu là chấp nhận được về mặt dược lý. Ví dụ, không hoặc độc tính thấp là đặc tính tốt hơn là có trong các nguyên liệu dược phẩm này.

Ví dụ về nguyên liệu dược phẩm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin như glyxin, alanin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin, chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa như axit ascorbic, natri sulfat, hoặc natri bisulfite, chất đệm như phosphat, xitrat, chất đệm borat, natri bicarbonat, và dung dịch tris-axit clohydric (Tris-HCl), chất độn như mannitol và glyxin, chất chelat hóa như axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), chất tạo phức như caffein, polyvinyl pyrrolidin, β -cyclodextrin, và hydroxypropyl- β -cyclodextrin, chất kéo dài như glucoza, mannoza, hoặc dextrin, monosacarit, disacarit, khác hydrat cacbon như glucoza, mannoza, và dextrin, chất tạo màu, chất tạo vị, chất pha loãng, chất nhũ hóa, chất bảo quản như

polyme ưa nước, ví dụ, polyvinyl pyrrolidin, polypeptit phân tử lượng thấp, ion đối tạo muối, benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salixylic, thimerosal, rượu phenetylic, metylparaben, propylparaben, chlorhexidin, axit sorbic, hoặc hydro peroxit, dung môi như glyxerin, propylen glycol, hoặc polyetylen glycol, rượu đường như mannitol hoặc sorbitol, phân tán chất, chất hoạt động bề mặt như PEG, sorbitan este, polysorbat, ví dụ, polysorbat 20 và polysorbat 80, triton, tromethamin, lexitin, hoặc cholesterol, chất nâng cao độ ổn định như sucroza và sorbitol, chất nâng cao độ đàn hồi như natri clorua, kali clorua, mannitol, và sorbitol, chất vận chuyển, chất pha loãng, tá dược, và/hoặc chất phụ gia dược phẩm.

Lượng của nguyên liệu dược phẩm này được bổ sung 0,001 đến 1000 lần, tốt hơn là 0,01 đến 100 lần, tốt hơn nữa là 0,1 đến 10 lần khối lượng của kháng thể kháng LAG-3 hoặc mảnh liên kết của nó, hoặc dạng được biến đổi của nó.

Liposom miễn dịch chứa kháng thể kháng LAG-3 hoặc mảnh liên kết của nó, hoặc dạng được biến đổi của kháng thể hoặc mảnh liên kết được bao nang trong liposome, hoặc kháng thể dạng được biến đổi chứa kháng thể được liên hợp với liposom (Patent Mỹ số US 6214388, v.v.) cũng nằm trong dược phẩm theo sáng chế.

Tá dược hoặc chất dẫn (chất mang) thường là lỏng hoặc rắn và không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là chúng là nguyên liệu được sử dụng cho sử dụng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa như nước để tiêm, nước muối, dịch não tủy nhân tạo, v.v. . Ví dụ về nước muối có thể bao gồm nước muối trung tính và nước muối chứa albumin huyết thanh.

Ví dụ về chất đệm có thể bao gồm chất đệm Tris được điều chỉnh để tạo ra pH cuối của dược phẩm là 7,0 đến 8,5, chất đệm axetat được điều chỉnh để tạo ra pH cuối của nó đến 4,0 đến 5,5, chất đệm xitrat được điều chỉnh để tạo ra pH cuối của nó đến 5,0 đến 8,0, và chất đệm histidin được điều chỉnh để tạo ra pH cuối của nó đến 5,0 đến 8,0.

Dược phẩm theo sáng chế là ở dạng rắn, lỏng, huyền phù, hoặc tương tự. Ví dụ khác về dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm dược phẩm đông khô. Dược phẩm đông khô có thể được tạo thành bằng cách sử dụng tá dược như sucroza.

Đường sử dụng của dược phẩm theo sáng chế có thể là bất kỳ trong số đường sử dụng trong ruột, sử dụng cục bộ, và sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ về nó có thể bao gồm trong sử dụng tĩnh mạch, sử dụng trong động mạch, sử dụng trong cơ, sử dụng trong da, sử dụng dưới da, sử dụng trong bụng, sử dụng áp da, sử dụng trong xương, sử dụng trong khớp, và tương tự.

Thành phần của dược phẩm có thể được xác định theo phương pháp sử dụng, ái lực liên kết của kháng thể đối với protein LAG-3, v.v. Kháng thể kháng LAG-3 hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, hoặc dạng được biến đổi của nó có ái lực cao hơn (giá trị KD thấp hơn) đối với protein LAG-3 có thể tạo ra hiệu quả của nó ở liều thấp hơn.

Liều kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế không bị giới hạn miễn là liều là lượng hiệu quả dược lý. Liều có thể là thích hợp được xác định theo loài của cá thể, loại của bệnh, triệu chứng, giới tính, độ tuổi, tình trạng bệnh lý trước đó, ái lực liên kết của kháng thể đối với protein LAG-3 hoặc hoạt tính sinh học của nó, và các yếu tố khác. Liều thường là 0,01 đến 1000 mg/kg, tốt hơn là 0,1 đến 100 mg/kg, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó có thể được sử dụng một lần mỗi ngày đến mỗi 180 ngày hoặc hai lần hoặc ba hoặc nhiều lần một ngày.

Ví dụ về dạng của dược phẩm có thể bao gồm dược phẩm dạng tiêm (bao gồm dược phẩm đông khô và giọt nhỏ), thuốc đạn, dược phẩm hấp thụ qua mũi, dược phẩm hấp thụ áp da, dược phẩm dưới lưỡi, viên nang, viên nén, thuốc mỡ, hạt nhỏ, sol khí, viên thuốc, bột, huyền phù, nhũ tương, thuốc nhỏ mắt, và dược phẩm cấy ghép sinh học.

Dược phẩm chứa kháng thể kháng LAG-3 hoặc mảnh liên kết của nó, hoặc dạng được biến đổi của nó làm thành phần hoạt tính có thể được sử dụng đồng thời với hoặc riêng rẽ với thuốc khác. Ví dụ, dược phẩm chứa kháng thể kháng LAG-3 hoặc mảnh liên kết của nó làm thành phần hoạt tính có thể được sử dụng sau khi sử dụng thuốc khác, hoặc thuốc khác có thể được sử dụng sau khi sử dụng dược phẩm. Theo một phương án khác, dược phẩm và thuốc khác có thể được sử dụng đồng thời.

Ví dụ về thuốc khác mà được sử dụng kết hợp với dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm antifolat, chất ức chế calcineurin, corticosteroid, globulin kháng tế bào

tuyến ức, chất chống chuyển hóa axit nucleic, chất ức chế tổng hợp axit nucleic, chất sinh học hướng đích kháng nguyên trên bề mặt tế bào, và chất sinh học hướng đích xytokin hoặc thụ thể xytokin, và các chất này được ưu tiên để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh tự miễn và/hoặc sự thải ghép. Ví dụ về thuốc khác có thể bao gồm Methotrexat mà là antifolat, Cyclosporin và Tacrolimus mà là chất ức chế calcineurin, Methylprednisolon và Prednisolon mà corticosteroit, Cyclophosphamid và Azathioprin mà là chất ức chế tổng hợp axit nucleic, Zetbulin, Lymphoglobulin, và Thymoglobulin mà là globulin kháng tế bào tuyến ức, Mycophenolat mofetil mà là chất chống chuyển hóa axit nucleic, Alemtuzumab, Rituximab, Abatacept, và Denosumab mà là chất sinh học hướng đích kháng nguyên trên bề mặt tế bào, và Adalimumab, Infliximab, Etanercept, và Tocilizumab mà là chất sinh học hướng đích xytokin hoặc thụ thể xytokin. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể hữu dụng còn để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh tự miễn và/hoặc sự thải ghép kết hợp với globulin miễn dịch trong tĩnh mạch (IVIg), thay thế huyết tương, v.v. Thuốc khác và liệu pháp này có thể được kết hợp với dược phẩm theo sáng chế còn để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh khác với các bệnh tự miễn và sự thải ghép.

Ví dụ về thuốc và liệu pháp mà có thể được kết hợp với dược phẩm theo sáng chế để điều trị hoặc ngăn ngừa u ác tính có thể bao gồm chất kháng ung thư như các thuốc hướng đích phân tử, chất hóa trị liệu, liệu pháp xạ trị, và các chất miễn dịch ung thư đặc trưng bởi kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1, và kháng thể kháng CTLA-4.

Một trong số thuốc khác và liệu pháp này, hoặc hai, ba, hoặc nhiều trong số chúng có thể được sử dụng hoặc được thừa nhận. Chúng còn được gọi là "sử dụng kết hợp thuốc khác" hoặc "kết hợp với thuốc khác". Sáng chế còn bao gồm dược phẩm theo sáng chế chứa thuốc khác này hoặc được sử dụng kết hợp với liệu pháp khác, ngoài kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, hoặc dạng được biến đổi của nó, theo một khía cạnh về "sử dụng kết hợp thuốc khác" hoặc "kết hợp với thuốc khác".

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh liên quan đối với tế bào dương tính với LAG-3 như các bệnh tự miễn, việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để điều chế dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh, và việc sử

dụng kháng thể theo sáng chế để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh. Sáng chế còn bao gồm kit để điều trị hoặc ngăn ngừa chứa kháng thể theo sáng chế.

6. Thuốc thử

Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo sáng chế, hoặc dạng được biến đổi của nó cũng hữu dụng làm thuốc thử. Thuốc thử này được sử dụng đối với thử nghiệm hoặc chuẩn đoán như được đề cập trên đây, đối với nghiên cứu, và đối với việc sử dụng bất kỳ khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách cụ thể thông qua các Ví dụ. Tuy nhiên sáng chế được cho là không bị giới hạn ở các Ví dụ này.

Quá trình liên quan đến thao tác gen trong Ví dụ sau đây được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) hoặc phương pháp được mô tả trong sổ tay thực nghiệm được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoặc bằng cách sử dụng thuốc thử hoặc kit có bán sẵn trên thị trường theo sổ tay hướng dẫn, trừ khi được chỉ ra theo cách khác.

Ví dụ 1. Quá trình điều chế kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người

1)-1 Tạo miễn dịch

Thế đột biến thiếu hụt vùng thứ nhất và thứ hai (vùng của vị trí 23 đến 262) từ đầu cuối N trong số bốn vùng ngoại bào giống globulin miễn dịch của LAG-3 ở người (SEQ ID No: 86: Fig. 101) được tạo dòng vô tính trong pcADN3.1 (Life Technologies Corp.) để điều chế lượng lớn plasmid biểu hiện pcADN3.1-hLAG-3_D3D4 bằng cách sử dụng kit EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen N.V). Sau khi xử lý sơ bộ cả bắp chân của chuột cái WKY/Izm (Japan SLC, Inc.) với Hyaluronidaza (Sigma-Aldrich), pcADN3.1-hLAG-3_D3D4 được tiêm trong cơ đến cùng một vị trí. Sau đó, bằng cách sử dụng ECM830 (BTX Global Logistics), các vị trí này được điện di in vivo bằng cách sử dụng điện cực hai kim. Một lần trong hai tuần, quá trình điện di in vivo này được lặp lại 3 hoặc 5 lần, và sau đó hạch bạch huyết của chuột được thu gom để phát triển tế bào lai.

1)-2 Quá trình điều chế tế bào lai

Tế bào hạch bạch huyết hoặc tế bào lá lách được dung hợp bằng điện với tế bào SP2/0-ag14 u tủy chuột bằng cách sử dụng hệ thống Hybrimun Hybridoma Production System (được sản xuất bởi Cyto Pulse Sciences, Inc.). Tế bào được dung hợp được pha loãng với môi trường chọn lọc ClonaCen1-HY Selection Medium D (được sản xuất bởi StemXen1 Technologies Inc.) và được nuôi cấy. Cụm tế bào lai mà xuất hiện được thu hồi để điều chế tế bào lai đơn dòng. Do đó mỗi cụm tế bào lai được thu hồi được nuôi cấy, và dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai thu được được sử dụng để sàng lọc đối với tế bào lai sản xuất kháng thể kháng LAG-3.

1)-3 Kháng thể sàng lọc bởi tế bào-ELISA

Plasmid biểu hiện (pcADN3.1/hLAG-3 và pcADN3.1/cynoLAG-3) được tạo cấu trúc bằng LAG-3 đơn dòng ở người hoặc khỉ cynomolgus trong pcADN3.1 hoặc plasmid đối chứng được bổ sung vào trong tế bào HEK293 bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000 (được sản xuất bởi Life Technologies Corp.), và tế bào được nuôi cấy trong vỉ tám 96 giếng (được sản xuất bởi Corning Inc.) qua đêm dưới điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong môi trường DMEM bao gồm 10% FBS. Sau khi loại bỏ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy, mỗi dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai được bổ sung, và vỉ để yên ở 4°C trong 1 giờ. Tế bào trong giếng được rửa một lần với PBS bao gồm 5% FBS. Sau đó, kháng thể kháng IgG-Peroxidaza ở chuột được tạo ra trong thỏ (được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Corp.) được pha loãng 500 lần với PBS bao gồm 5% FBS được bổ sung vào đó, và vỉ để yên ở 4°C trong 1 giờ. Tế bào trong giếng được rửa 5 lần với PBS bao gồm 5% FBS. Sau đó, dung dịch sinh màu OPD (được điều chế bằng cách hòa tan o-phenylendiamin dihydroclorua (được sản xuất bởi Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) và H₂O₂ ở nồng độ 0,4 mg/mL và 0,6% (v/v) một cách tương ứng, trong dung môi OPD (trinitrat 0,05 M và dinatri hydrophosphat dodecahydrat 0,1 M, pH 4,5)) được bổ sung vào đó ở 25 µL/giếng. Phản ứng màu được thực hiện với khuấy không thường xuyên và được làm dừng bằng cách bổ sung 25 µL/giếng của HCl 1 M. Sau đó, độ hấp thụ được đo ở 490 nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc dạng tấm (ENVISION; PerkinElmer, Inc.). Để chọn tế bào lai sản xuất kháng thể mà liên kết với một cách đặc hiệu LAG-3 được biểu hiện trên bề mặt màng tế bào, tế bào lai mà tạo ra dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy có độ hấp thụ cao hơn

đối với tế bào HEK293 được chuyển nhiễm vector sự biểu hiện LAG-3 hơn đối với tế bào HEK293 được chuyển nhiễm plasmid đối chứng tự do từ gen LAG-3 được chọn làm tế bào lai dương tính quá trình sản xuất kháng thể kháng LAG-3.

1)-4 Sàng lọc kháng thể bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng

Ngoài ra, còn được xác định rằng bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng mà kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai được xác định là dương tính bằng tế bào-ELISA trong Ví dụ 1)-3 liên kết với PHA (phytohemagglutinin) hoạt hóa tế bào T ở người (Tế bào máu chưa trưởng thành PHA), nhiều tế bào sinh lý học biểu hiện LAG-3. Đối với PBMC ở người được kích thích với 2 $\mu\text{g/mL}$ của PHA (được sản xuất bởi Sigma-Aldrich) trong ba ngày, được bổ sung dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai để tạo huyền phù, sau đó phản ứng ở 4°C đối với 30 phút. Sau khi rửa với chất đệm FACS (PBS, 0,1%BSA, và 0,1% natri azit), kháng thể thứ cấp như thể liên hợp kháng IgG PE ở chuột (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) được pha loãng 200 lần với chất đệm FACS chứa thuốc nhuộm phản ứng huỳnh quang LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit-near-IR (được sản xuất bởi Invitrogen Corp.) được bổ sung vào đó để tạo huyền phù, sau đó để yên ở 4°C trong 30 phút. Sau khi rửa với chất đệm FACS, tế bào được phân tán lại trong PBS bao gồm 1 đến 2% paraformaldehyt, sau đó bằng cách phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng (CantoII: được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company hoặc FC500: được sản xuất bởi Beckman Coulter Inc). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị FlowJo (được sản xuất bởi Tree Star Inc). Sau khi loại bỏ tế bào chế dương tính với thuốc nhuộm phản ứng huỳnh quang LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit-near-IR bằng cách khoanh vùng, biểu đồ của cường độ huỳnh quang của tế bào sống sót được dựng đồ thị.

1)-5 Sàng lọc bằng thử nghiệm ADCC

1)-5-1 Quá trình điều chế tế bào đích

Tế bào 293FT (Invitrogen Corp.) được chuyển nhiễm với pLenti6/V5-GW/lacZ, và ViraPower™ Packaging Mix (Invitrogen Corp.) theo quy trình đính kèm để điều chế lentivirus (virus chậm) tái tổ hợp để biểu hiện gen β -galactosidaza. Tế bào 293T được chuyển nhiễm bằng lentivirus tái tổ hợp thu được theo quy trình của hệ thống

biểu hiện lentivirus ViraPower Lentiviral Expression Systems (Invitrogen Corp). Tế bào được chuyển nhiễm virus được chọn bằng cách sử dụng 10 $\mu\text{g/mL}$ tế bào blasticidin (Invitrogen Corp.) để thu được dòng biểu hiện ổn định β -galactosidaza. Plasmid biểu hiện của LAG-3 ở người chiều dài hoàn chỉnh được bổ sung vào trong tế bào 293T biểu hiện ổn định β -galactosidaza (sau đây, được gọi là 293T-lacZ) bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000 (được sản xuất bởi Invitrogen Corp.), và tế bào được nuôi cấy trong 1 ngày và sau đó được phân ly và được thu hồi bằng cách sử dụng TrypLEExpress (được sản xuất bởi Invitrogen Corp). Tế bào được rửa hai lần với RPMI1640 không chứa phenol đỏ bao gồm 5% FBS (sau đây, được gọi là "môi trường đối với ADCC"). Các tế bào sống sót được đếm bằng cách thử nghiệm loại bỏ thuốc nhuộm trypan xanh. Tế bào được phân tán lại đến 1×10^5 tế bào/ml trong môi trường đối với ADCC và được sử dụng làm tế bào đích.

1)-5-2 Quá trình điều chế tế bào đáp ứng

PBMC được tách riêng từ máu ngoại vi người bằng cách ly tâm Ficoll, và huyền phù được điều chỉnh đến mật độ tế bào sống sót $1,2 \times 10^6$ tế bào/mL trong môi trường đối với ADCC được sử dụng làm tế bào đáp ứng.

1)-5-3 ADCC thử nghiệm

Vi tâm 96 giếng đáy chữ U bao gồm 50 μL /giếng của dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai, được bổ sung 50 μL /giếng của tế bào đích của 1)-5-1, sau đó để yên ở 4°C trong 30 phút. Sau bổ sung 150 μL /giếng của môi trường đối với ADCC vào đó, sau đó bằng cách khuấy, tấm được ly tâm ở nhiệt độ phòng ở 1200 rpm trong 5 phút để loại bỏ 200 μL /giếng của dịch nổi bề mặt. Sau đó, 125 μL /giếng của tế bào đáp ứng của 1)-5-2 được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách ly tâm ở nhiệt độ phòng ở 1200 rpm trong 5 phút. Sau đó, tế bào được nuôi cấy qua đêm dưới điều kiện 37°C và 5% CO_2 . Vào ngày tiếp theo, 50 μL của dịch nổi bề mặt được thu hồi trong tấm đen (được sản xuất bởi Corning Inc). 50 μL của dung dịch hệ thử nghiệm β -Glo (được sản xuất bởi Promega Corp.) được bổ sung vào đó. Cường độ phát quang được đo bằng cách sử dụng thiết bị đọc dạng tấm (ENVISION; được sản xuất bởi PerkinElmer, Inc). Phần trăm của tế bào được dung giải bởi hoạt tính ADCC được tính theo phương trình sau đây.

Phần trăm của tế bào được dung giải (%) = $(A - B)/(C - B) \times 100$

A: Lượng của mỗi giếng mẫu

B: Trung bình của lượng giải phóng tự phát (giếng không được bổ sung kháng thể) (n = 3)

Khi bổ sung kháng thể, 50 μ L của môi trường đối với ADCC được bổ sung vào đó. Ngoại trừ điều này, quá trình giống như trong giếng mẫu được thực hiện.

C: Trung bình của lượng giải phóng tối đa (giếng bao gồm tế bào đích được dung giải với chất hoạt động bề mặt) (n = 3)

Khi bổ sung kháng thể và bổ sung tế bào đáp ứng, 50 μ L và 75 μ L của môi trường đối với ADCC lần lượt được bổ sung vào đó. Đối với thử nghiệm, 175 μ L của dung dịch hệ thử nghiệm β -Glo được bổ sung vào mỗi giếng bao gồm tế bào đích và được trộn vào đó. 100 μ L phân ước của nó được bổ sung vào tấm đen để thực hiện thử nghiệm.

1)-6 Sàng lọc bằng cách thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II

Quá trình này được thực hiện theo thông báo trước đây (Tài liệu phi sáng chế 8). Cụ thể là, 20 μ L/giếng của LAG-3-Fc (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) được pha loãng với RPMI1640 bao gồm 10% FBS đến 25 nM được bổ sung vào vi đĩa 96 giếng đáy chữ U, và 20 μ L/giếng của dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách khuấy và để yên ở 4°C trong 20 phút. Sau đó, 10 μ L/giếng (2.5×10^5 tế bào/giếng) của tế bào Raji, mà biểu hiện nội sinh cao phân tử MHC nhóm II, được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách khuấy và để yên ở 4°C trong 20 phút nữa. Tế bào được rửa hai lần với PBS hoặc chất đệm FACS, sau đó thể liên hợp kháng IgG PE ở người (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) được pha loãng 200 lần với chất đệm FACS được bổ sung vào đó để tạo huyền phù, sau đó để yên ở 4°C trong 20 phút. Sau khi rửa với PBS hoặc chất đệm FACS, tế bào được phân tán lại trong PBS bao gồm 1 đến 2% paraformaldehyt, sau đó bằng cách phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng (CantoII: được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company hoặc FC500: được sản xuất bởi Beckman Coulter Inc). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng FlowJo (được sản xuất bởi Tree Star Inc.), và phần trăm của ức chế được tính bằng cách phương trình sau đây.

Phần trăm của ức chế (%) = $100 - (A - B)/(C - B) \times 100$

A: Cường độ huỳnh quang trung bình của mỗi giếng mẫu

B: Cường độ huỳnh quang trung bình của nền

Khi bổ sung LAG-3-Fc và kháng thể, 20 μ L của môi trường được bổ sung mỗi lần. Ngoại trừ điều này, quá trình giống như trong giếng mẫu được thực hiện.

C: Cường độ huỳnh quang trung bình của việc liên kết tối đa

Khi bổ sung kháng thể, 20 μ L của môi trường được bổ sung vào đó.

1)-7 Quá trình tinh chế của kháng thể đơn dòng

Kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người đơn dòng được tinh chế từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai. Cụ thể là, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai thứ nhất được sử dụng cho cột ProteinG (được sản xuất bởi GE Healthcare) được làm cân bằng với PBS. Sau khi rửa cột với PBS, phân đoạn chứa kháng thể được thu gom bằng cách rửa giải với 0,1 M glyxin/dung dịch nước axit clohydric (pH 2,7). Để được thu gom phân đoạn, Tris-HCl 1M (pH 9,0) được bổ sung để điều chỉnh đến pH 7,0 đến 7,5, và sau đó ly tâm bằng thiết bị Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (khối lượng phân tử phân đoạn UF30K, được sản xuất bởi Sartorius AG) được sử dụng để thay thế chất đệm với PBS và cô kháng thể để điều chỉnh đến 2 mg/mL hoặc nhiều hơn. Sau cùng, lọc với Minisart-Plus filter (được sản xuất bởi Sartorius AG) được thực hiện để tạo ra mẫu được tinh chế.

Ví dụ 2. Quá trình đánh giá in vitro của kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264)

2)-1 Hoạt tính liên kết của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264) đối với tế bào T được hoạt hóa ở người

Hoạt tính liên kết của kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264 được tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1)-7 đối với tế bào T được hoạt hóa ở người được nghiên cứu. Như được thể hiện trong Fig. 1, tất cả kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người được liên kết với Tế bào máu chưa trưởng thành PHA được điều chế làm tế bào T được hoạt hóa ở người in vitro theo cách phụ thuộc vào nồng độ.

2)-2 hoạt tính ADCC của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264)

Hoạt tính ADCC của kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người được tinh chế rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264 được nghiên cứu bằng phương pháp sau đây. Đối với vi tấm 96 giếng đáy chữ U bao gồm 50 µL/giếng của dung dịch kháng thể, được bổ sung 50 µL/giếng của tế bào đích (mà sau đây còn được gọi là tế bào 293T-lacZ/hLAG-3) của Ví dụ 1)-5-1, sau đó để yên ở 4°C trong 30 phút. Sau đó, 75 µL/giếng của tế bào đáp ứng được điều chế như trong Ví dụ 1)-5-2 (tuy nhiên được phân tán đến 2×10^6 tế bào/mL) được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách ly tâm ở nhiệt độ phòng ở 1200 rpm trong 5 phút, và sau đó tế bào được nuôi cấy qua đêm dưới điều kiện 37°C và 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, 50 µl của dịch nổi bề mặt được thu hồi trong tấm đen (được sản xuất bởi Corning Inc). Dung dịch của hệ thử nghiệm β-Glo (được sản xuất bởi Promega Corp.) được bổ sung vào đó ở 50 µl/giếng. Cường độ phát quang được đo bằng cách sử dụng thiết bị đọc dạng tấm (ENVISION; được sản xuất bởi PerkinElmer, Inc). Phần trăm của tế bào được dung giải bởi hoạt tính ADCC được tính theo phương trình sau đây.

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

A: Lượng của mỗi giếng mẫu

B: Trung bình của lượng giải phóng tự phát (giếng không được bổ sung kháng thể) (n = 3)

Khi bổ sung kháng thể, 50 µL của môi trường đối với ADCC được bổ sung vào đó. Ngoại trừ điều này, quá trình giống như trong giếng mẫu được thực hiện.

C: Trung bình của lượng giải phóng tối đa (giếng bao gồm tế bào đích được dung giải với chất hoạt động bề mặt) (n = 3)

Khi bổ sung kháng thể và bổ sung tế bào đáp ứng, 50 µL và 75 µL của môi trường đối với ADCC được bổ sung vào đó lần lượt. Đối với thử nghiệm, 175 µl của dung dịch hệ thử nghiệm β-Glo được bổ sung vào mỗi giếng bao gồm tế bào đích và được trộn vào đó. 100 µl phân ước của nó được bổ sung vào tấm đen để thực hiện thử nghiệm.

Như được thể hiện trong Fig. 2, tất cả kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người thể hiện hoạt tính ADCC phụ thuộc vào nồng độ in vitro trên tế bào biểu hiện LAG-3 ở người. Ngược lại, các kháng thể này không thể hiện hoạt tính ADCC trên tế bào 293T-lacZ trong đó gen LAG-3 ở người không được chuyển nhiễm, vì vậy hoạt tính là đặc hiệu.

2)-3 Nghiên cứu đối với hoạt tính ức chế của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264) trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II

Quá trình này được nghiên cứu bằng cách thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II theo Ví dụ 1)-6 việc liệu kháng thể kháng LAG-3 được tinh chế (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264) có hoạt tính ức chế chống lại liên kết của LAG-3 đối với phân tử MHC nhóm II, mà được thông báo là phối tử của nó. Như được thể hiện trong Fig. 3A, kết quả cho thấy rằng tất cả 5 dòng vô tính của kháng thể hầu như không thể hiện hoạt tính ức chế trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II và có không ảnh hưởng trên liên kết với phân tử MHC nhóm II, mà được xem là cần thiết đối với LAG-3 để tạo ra chức năng ức chế tế bào T. Ngược lại, như được thể hiện trong Fig. 3B, kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 IMP731 (Tài liệu sáng chế 1) mà là kháng thể thông thường trong Tài liệu trích dẫn thể hiện hoạt tính ức chế mạnh theo cách phụ thuộc vào nồng độ trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II.

2)-4 Nghiên cứu đối với hoạt tính ức chế của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264) trong thử nghiệm kết dính tế bào 293T-hLAG-3/Raji

Trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II theo Ví dụ 2)-3, liên kết của thể liên hợp kháng IgG PE ở người kháng thể thứ cấp để phát hiện liên kết của LAG-3-Fc đối với tế bào Raji có thể bị ức chế bởi sự cản trở không gian gây ra bởi liên kết của kháng thể kháng LAG-3 với LAG-3-Fc, và do đó khả năng thể hiện một cách rõ ràng cường độ huỳnh quang thấp không thể bị loại trừ một cách hoàn toàn, bất kể kháng thể không ức chế trực tiếp liên kết của LAG-3/MHC nhóm II trên thực tế. Do đó, đối với hệ đánh giá mà không bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp để phát hiện, hệ thử

nghiệm kết dính tế bào 293T-hLAG-3/Raji sau đây được tạo cấu trúc để đánh giá kháng thể.

Plasmid biểu hiện LAG-3 ở người pcADN3.1/hLAG-3 được bổ sung vào trong tế bào 293T bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000 (được sản xuất bởi Life Technologies Corp.), và tế bào được ủ trên vi tấm 96 giếng được bọc bằng BioCoat Poly-D-Lysin (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company) và được nuôi cấy qua đêm. Trong khi đó, tế bào Raji được đánh dấu trong môi trường (RPMI1640 bao gồm 10% FBS) với thuốc nhuộm huỳnh quang BCECF-AM (được sản xuất bởi DOJINDO LABORATORIES, được sử dụng ở 10 μ M) ở 37°C trong 1 giờ, sau đó rửa và sau đó phân tán trong môi trường đến $1,6 \times 10^6$ tế bào/mL. Sau khi truyền nhiễm, môi trường của tế bào (293T-hLAG-3 tế bào) được nuôi cấy qua đêm được loại bỏ, và 50 μ L/giếng của môi trường và 25 μ L/giếng của dung dịch kháng thể được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách ủ sơ bộ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, 25 μ L/giếng của tế bào Raji được đánh dấu BCECF-AM được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách ly tâm ở 900 rpm trong 30 giây và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau phản ứng, giếng được rửa với môi trường hai ba lần để loại bỏ tế bào không bám dính, và tế bào được dung giải trong 100 μ L/giếng của chất đệm Tris (25 mM, pH 8,0) bao gồm 0,1% NP-40, để đo cường độ huỳnh quang của giếng với thiết bị đọc dạng tấm (ENVISION: được sản xuất bởi PerkinElmer Inc). Phần trăm của ức chế được tính bằng cách phương trình sau đây.

$$\text{Phần trăm của ức chế (\%)} = 100 - (A - B)/(C - B) \times 100$$

A: Cường độ huỳnh quang của mỗi giếng mẫu

B: Cường độ huỳnh quang của nền

Khi bổ sung tế bào Raji và kháng thể, môi trường được bổ sung vào đó. Ngoài trừ điều này, quá trình giống như trong giếng mẫu được thực hiện.

C: Cường độ huỳnh quang của việc liên kết tối đa

Khi bổ sung kháng thể, môi trường được bổ sung vào đó.

Như được thể hiện trong Fig. 4, kết quả cho thấy rằng tất cả kháng thể kháng LAG-3 được tinh chế ở chuột rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264 hầu như không thể hiện hoạt tính ức chế trong thử nghiệm kết dính tế bào 293T-hLAG-3/Raji, ngoài ra để hỗ trợ cho quan điểm rằng kháng thể có không ảnh hưởng trên liên

kết với phân tử MHC nhóm II, mà được xem là cần thiết đối với LAG-3 tạo ra chức năng ức chế tế bào T. Ngược lại, kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 IMP731 (Tài liệu sáng chế 1) mà là kháng thể thông thường trong Tài liệu trích dẫn thể hiện hoạt tính ức chế mạnh với phần trăm ức chế 90% ở nồng độ của 10 µg/mL trong thử nghiệm này.

2)-5 Xác định epitop của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264)

Dựa trên thực tế rằng kháng thể kháng LAG-3 ở chuột rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và kháng thể rLA1264 được tạo ra bằng cách sử dụng thể đột biến thiếu hụt vùng thứ nhất và thứ hai (mà sau đây lần lượt còn được gọi là vùng 1 và 2) từ đầu cuối N trong số bốn vùng giống globulin miễn dịch có mặt trong vùng ngoại bào của LAG-3 làm chất sinh, để chứng minh rằng vùng thứ ba và thứ tư của nó (mà sau đây lần lượt còn được gọi là vùng 3 và 4) từ đầu cuối N các kháng thể này liên kết với, sự liên kết của kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được đối với tế bào biểu hiện vùng 3 và 4, hoặc chỉ vùng 4, được nghiên cứu bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Mỗi plasmit biểu hiện (được tạo dòng vô tính trong pcADN3.1) của vùng 3 và trở đi (263-525) hoặc vùng 4 và trở đi (353-525) của LAG-3 ở người với trình tự chất đánh dấu FLAG (DYKDDDDK) được bổ sung vào đầu cuối N được bổ sung vào trong tế bào HEK293T bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000 (được sản xuất bởi Life Technologies Corp.), và tế bào được nuôi cấy trong 1 ngày và sau đó được thu hồi, để nghiên cứu hoạt tính liên kết của kháng thể bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1)-4. Kết quả là, tất cả kháng thể kháng LAG-3 được tinh chế ở chuột rLA204, rLA212, và rLA225 được liên kết với tế bào biểu hiện cấu trúc bao gồm vùng 3 và 4, trái lại không kháng thể nào trong số chúng được liên kết với tế bào biểu hiện cấu trúc chỉ bao gồm vùng 4, như được thể hiện trong Fig. 5A. Kết quả này cho thấy rằng tất cả kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được rLA204, rLA212, và rLA225 được liên kết với vùng 3 trong số bốn vùng giống globulin miễn dịch có mặt trong vùng ngoại bào của LAG-3.

Thử nghiệm cùng loại bằng cách sử dụng dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai cho thấy rằng kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được rLA869 và rLA1264 cũng được liên kết với vùng 3.

Fig. 5B thể hiện kết quả của nghiên cứu vùng liên kết của kháng thể kháng LAG-3 ở người dạng khảm-người IMP731 mà là kháng thể thông thường trong Tài liệu trích dẫn cũng bằng phương pháp này. Ngoài hai loại cấu trúc trong Fig. 5A, plasmit biểu hiện được sử dụng của vùng 2 và trở đi (các vị trí axit amin 173-525 của trình tự axit amin LAG-3 ở người trong SEQ ID No: 86, Fig. 101) của LAG-3 ở người với trình tự chất đánh dấu FLAG (DYKDDDDK) được bổ sung vào đầu cuối N và chiều dài hoàn chỉnh của LAG-3 ở người (cả hai đều được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng pcADN3.1; trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của LAG-3 ở người được mô tả trong SEQ ID No: 85, Fig. 100). Cả IMP731 và dòng kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người vô tính 6D7 được tạo ra trong Ví dụ 2)-6 được liên kết với tế bào biểu hiện chiều dài hoàn chỉnh của LAG-3 ở người nhưng không liên kết với thể đột biến (FLAG-D2D3D4, FLAG-D3D4, và FLAG-D4) thiếu hụt vùng 1, nhờ đó cho thấy rằng chúng liên kết với vùng 1. Cụ thể là, cho thấy rằng kháng thể kháng LAG-3 ở chuột thu được rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264 liên kết với vùng 3 trong số bốn vùng giống globulin miễn dịch có mặt trong vùng ngoại bào của LAG-3 nhận dạng epitop khác so với IMP731 mà liên kết với vùng 1.

2)-6 Tạo ra kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người bằng cách sử dụng protein LAG-3 được tinh chế làm chất sinh miễn dịch

Đối với phương pháp tạo miễn dịch khác Ví dụ 1)-1, kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người thu được bằng cách sử dụng protein LAG-3 được tinh chế làm chất sinh miễn dịch. Nhũ tương được tạo thành bằng cách trộn lẫn protein với chất đánh dấu His được bổ sung vào đầu cuối C của vùng ngoại bào (1-450) của LAG-3 ở người với tá chất hoàn chỉnh Freund (được sản xuất bởi Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) (ở tỷ lệ thể tích 1:2) được sử dụng cho đầu xương cụt của chuột cái WKY/Izm 8 tuần tuổi (Japan SLC, Inc.) trong lượng 200 µg mỗi chuột. Ba tuần sau đó, chỉ protein kháng nguyên được sử dụng cho đầu xương cụt trong lượng 200 µg mỗi chuột, và hai tuần sau đó, hạch bạch huyết được thu gom để phát triển tế bào lai bằng phương pháp

của Ví dụ 1)-2. Sàng lọc bằng phương pháp của Ví dụ 1)-3 và 1)-4, v.v., và phân tích của epitop kháng thể thu được đơn dòng bằng phương pháp của Ví dụ 2)-5 cho thấy rằng, trong số bốn vùng giống globulin miễn dịch có mặt trong vùng ngoại bào của LAG-3, 58% của dòng vô tính được đánh giá được liên kết với vùng 1, và 26% của nó được liên kết với vùng 2, sao cho tốt hơn là kháng thể đơn dòng chống lại các phần gần với đầu cuối N thu được. Trong số chúng, hầu hết các dòng vô tính mà được liên kết mạnh với tế bào T được hoạt hóa ở người (tế bào máu chưa trưởng thành PHA) trong phương pháp đếm tế bào theo dòng, bao gồm dòng vô tính 6D7, được liên kết với vùng 1 của LAG-3, và tất cả của chúng thể hiện hoạt tính ức chế mạnh trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II được mô tả trong Ví dụ 2)-3. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các kết quả phát hiện trước đây (Tài liệu phi sáng chế 4) mà vùng 1 và 2 của đầu cuối N trong số bốn vùng ngoại bào giống globulin miễn dịch của LAG-3 quan trọng đối với liên kết của LAG-3 với phân tử MHC nhóm II và cho thấy rằng, để kháng thể thu được mà không ức chế liên kết của LAG-3 đối với phân tử MHC nhóm II, cụ thể là, chức năng ức chế tế bào T của LAG-3, nó cần thiết để phát triển kháng thể đơn dòng bằng cách thực hiện phương pháp tạo miễn dịch này như trong Ví dụ 1)-1,

Ví dụ 3. Xác định trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264)

3)-1 Xác định trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của rLA204

3)-1-1 Quá trình điều chế ARN hoàn chỉnh từ tế bào lai sản xuất rLA204

Để khuếch đại cADN chứa vùng biến đổi của rLA204, ARN hoàn chỉnh được điều chế từ tế bào lai sản xuất rLA204 bằng cách sử dụng thuốc thử TRIzol (Ambion/Thermo Fisher Scientific Inc.).

3)-1-2 Tổng hợp cADN (5'-RACE-Ready cADN)

CADN (5'-RACE-Ready cADN) được tổng hợp bằng cách sử dụng khoảng 1 μ g của ARN hoàn chỉnh được điều chế trong Ví dụ 3)-1-1 và kit khuếch đại SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc).

3)-1-3 khuếch đại 5'-RACE PCR và giải trình tự của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA204

Đoạn mồi được sử dụng để khuếch đại PCR của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng gen của rLA204 là oligonucleotit có trình tự của UPM (Universal Primer Mix; kèm theo kit khuếch đại SMARTer RACE cDNA Amplification Kit) và 5'-CTCCAGAGTTCCAGGTCACGGTGACTGGC-3' (RG2AR3; SEQ ID NO: 71). UPM được sử dụng kèm theo kit khuếch đại SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc.), đồng thời RG2AR3 được thiết kế từ trình tự của vùng hằng định chuỗi nặng chuột trong cơ sở dữ liệu.

cADN chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA204 được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi này và cADN (5'-RACE-Ready cADN) được tổng hợp trong Ví dụ 3)-1-2 làm mẫu. PCR này được thực hiện trên chương trình chương trình Touchdown PCR theo sổ tay của kit khuếch đại SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc.) bằng cách sử dụng polymeaza KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.).

cADN chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế MinElute PCR Purification Kit (Qiagen N.V.) và sau đó được tạo dòng vô tính bằng cách sử dụng kit tạo dòng Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen Corp.). cADN chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được tạo dòng vô tính được phân tích bằng cách giải trình tự.

Đoạn mồi giải trình tự được sử dụng là oligonucleotit có trình tự 5'-CTCCAGAGTTCCAGGTCACGGTGACTGGC-3' (RG2AR3; SEQ ID No: 71) được thiết kế từ trình tự của vùng hằng định chuỗi nặng chuột trong cơ sở dữ liệu, và NUP (Nested Universal Primer A: kèm theo kit khuếch đại SMART RACE cDNA Amplification Kit).

Trình tự nucleotit được xác định của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA204 được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

3)-1-4 khuếch đại 5'-RACE PCR và giải trình tự của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA204

Đoạn mồi được sử dụng để khuếch đại PCR của cADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gen của rLA204 là UPM (Universal Primer Mix; kèm theo kit khuếch

đại SMARTer RACE cDNA Amplification Kit) và oligonucleotit có trình tự 5'-TCAGTAACACTGTCCAGGACACCATCTC-3' (RKR5: SEQ ID NO: 72). UPM được sử dụng kèm theo kit khuếch đại SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc.), đồng thời RKR5 được thiết kế từ trình tự của vùng hằng định chuỗi nhẹ chuột trong cơ sở dữ liệu.

cADN chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA204 được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi này và cADN (5'-RACE-Ready cADN) được tổng hợp trong Ví dụ 3)-1-2 làm mẫu. PCR này được thực hiện trên chương trình Touchdown PCR theo sổ tay của kit khuếch đại SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc.) bằng cách sử dụng polymeaza KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.).

cADN chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế MinElute PCR Purification Kit (Qiagen N.V.) và sau đó được tạo dòng vô tính bằng cách sử dụng Kit tạo dòng Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen Corp.). CADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được tạo dòng vô tính được phân tích bằng cách giải trình tự.

Đoạn mồi giải trình tự được sử dụng là oligonucleotit có trình tự 5'-TCAGTAACACTGTCCAGGACACCATCTC-3' (RKR5; SEQ ID No: 72) được thiết kế từ trình tự của vùng hằng định chuỗi nhẹ chuột trong cơ sở dữ liệu, và NUP (Nested Universal Primer A: kèm theo kit khuếch đại SMART RACE cDNA Amplification Kit).

Trình tự nucleotit được xác định của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA204 được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

3)-2 Xác định trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của rLA212

Trình tự được xác định theo cách giống như trong Ví dụ 3)-1.

Trình tự nucleotit được xác định của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA212 được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 6. Trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi

nhẹ của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 8.

3)-3 Xác định trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của rLA225

Trình tự được xác định theo cách giống như trong Ví dụ 3)-1.

Trình tự nucleotit được xác định của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA225 được thể hiện trong SEQ ID No: 9, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 10. Trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 11, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 12.

3)-4 Xác định trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của rLA869

Trình tự được xác định theo cách giống như trong Ví dụ 3)-1.

Trình tự nucleotit được xác định của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA869 được thể hiện trong SEQ ID No: 13, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 14. Trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 15, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 16.

3)-5 Xác định trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi của rLA1264

Trình tự được xác định theo cách giống như trong Ví dụ 3)-1.

Trình tự nucleotit được xác định của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA1264 được thể hiện trong SEQ ID No: 17, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 18. Trình tự nucleotit của cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 19, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 20.

Ví dụ 4. Phát triển kháng thể người dạng kháng LAG-3 ở người (cLA212)

4)-1 Tạo cấu trúc vectơ biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được nhân hóa pCMA-LK

Plasmid pcADN3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen Corp.) được tiêu hóa với enzym giới hạn XbaI và PmeI. Mảnh thu được khoảng 5,4 kb được buộc với mảnh ADN chứa trình tự ADN được thể hiện trong SEQ ID No: 21 và mã hóa tín hiệu gây tiết chuỗi nhẹ ở người và vùng hằng định chuỗi κ ở người bằng cách sử dụng kit tạo dòng In-

Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.) để điều chế pcADN3.3/LK.

PCR được thực hiện với pcADN3.3/LK làm mẫu bằng cách sử dụng bộ đoạn môi được thể hiện sau đây. Mảnh thu được khoảng 3,8 kb được phosphoryl hóa và sau đó được tự buộc để tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được nhân hóa pCMA-LK có trình tự tín hiệu, vị trí đơn dòng, và vùng hằng định chuỗi nhẹ ở người, vùng cùng hướng của vùng gen khởi động CMV.

Bộ đoạn môi

5'-TATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGC-3' (3,3-F1: SEQ ID NO: 73)

5'-GCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTG-3' (3,3-R1: SEQ ID NO: 74)

4)-2 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng loại IgG1 kháng thể khảm và được nhân hóa pCMA-G1

Mảnh ADN thu được mà từ đó chuỗi nhẹ tín hiệu gây tiết và vùng hằng định chuỗi κ ở người được loại bỏ bằng cách tiêu hủy pCMA-LK với XbaI và PmeI được liên kết với mảnh ADN chứa trình tự ADN được thể hiện trong SEQ ID No: 22 và mã hóa axit amin của trình tự tín hiệu chuỗi nặng ở người và vùng hằng định IgG1 ở người bằng cách sử dụng kit tạo dòng In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.) để tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng loại IgG1 kháng thể khảm và được nhân hóa pCMA-G1 có trình tự tín hiệu, vị trí đơn dòng, và vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 ở người, vùng cùng hướng của vùng gen khởi động CMV.

4)-3 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng cLA212

Mảnh ADN chứa cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng được khuếch đại với KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.) và bộ đoạn môi được thể hiện sau đây, bằng cách sử dụng cADN thu được trong Ví dụ 3)-2 và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của rLA212 làm khuôn mẫu, và mảnh ADN được khuếch đại được chèn vào vị trí được phân cắt bởi enzym giới hạn BlnI của vector biểu hiện chuỗi nặng loại IgG1 dạng khảm và được nhân hóa pCMA-G1 bằng cách sử dụng kit tạo dòng In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.) để tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng cLA212. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA-G1/cLA212". Trình tự nucleotit của

chuỗi nặng cLA212 được thể hiện trong SEQ ID No: 23, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 24.

Bộ đoạn môi đối với chuỗi nặng cLA212

5'-CCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG-3'

(212H-F; SEQ ID No: 75)

5'-CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACTGTGACCATGACTCCTTGGCCCCAG-3'

(212H-R; SEQ ID No: 76)

4)-4 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ cLA212

Mảnh ADN chứa cADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại với KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.) và bộ đoạn môi được thể hiện sau đây, bằng cách sử dụng cADN thu được trong Ví dụ 3)-2 và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của rLA212 làm khuôn mẫu, và mảnh ADN được khuếch đại được chèn vào vị trí được phân cắt bằng enzym giới hạn BsiWI của vector chung biểu hiện chuỗi nhẹ dạng khảm và được nhân hóa pCMA-LK bằng cách sử dụng kit tạo dòng In-Fusion HD PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.) để tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ cLA212. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA-LK/cLA212". Trình tự nucleotit của cLA212 chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID No: 25, và trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 26.

Bộ đoạn môi đối với cLA212 chuỗi nhẹ.

5'-ATCTCCGGCGCGTACGGCAACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAAATCC-3'

(212L-F; SEQ ID No: 77)

5'-GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAGTTCCAGCTCGGTCCCAGC-3'

(212L-R; SEQ ID No: 78)

4)-5 Quá trình sản xuất cLA212

Tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) cấy chuyển đầu tiên và được nuôi cấy theo sổ tay. $1,2 \times 10^9$ tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) trong pha nuôi cấy logarit được ủ trong Fernbach Erlenmeyer Flask dung tích 3L (Corning Inc.), được điều chỉnh đến $2,0 \times 10^6$ tế bào/ml bằng cách pha loãng với môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.), và sau đó được nuôi cấy kèm khuấy ở 90 rpm ở 37°C trong 1 giờ trong thiết bị ủ 8% CO₂. 1,8 mg của polyetylenimin (Polysciences

#24765) được hòa tan trong 20 ml của môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.). Tiếp theo, mỗi vector biểu hiện chuỗi H (0,24 mg) và mỗi vector biểu hiện chuỗi L (0,36 mg) được điều chế bằng cách sử dụng NucleoBond Xtra (Takara Bio Inc.) được bổ sung đến 20 ml của môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.). 20 ml của dung dịch được trộn lẫn vector biểu hiện/Opti-Pro SFM được bổ sung đến 20 ml của dung dịch được trộn lẫn polyetylenimin/Opti-Pro SFM, và hỗn hợp được khuấy nhẹ, để yên trong 5 phút, và sau đó được bổ sung vào tế bào FreeStyle 293F. Tế bào được nuôi cấy kèm khuấy ở 90 rpm ở 37°C trong 4 giờ trong thiết bị ủ 8% CO₂. Sau đó, 600 ml của môi trường EX-XENL VPRO (SAFC Biosciences), 18 ml của GlutaMAX I (GIBCO/Thermo Fisher Scientific Inc.), và 30 ml của Menolat Ultrafiltrat (GIBCO/Thermo Fisher Scientific Inc.) được bổ sung vào đó. Tế bào được nuôi cấy kèm khuấy ở 90 rpm ở 37°C trong 7 ngày trong thiết bị ủ 8% CO₂, và dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được được lọc thông qua thiết bị lọc Disposable Capsule Filter (Advantec #CCS-045-E1H).

Kháng thể rLA212 người dạng khảm thu được bằng kết hợp pCMA-G1/cLA212 và pCMA-LK/cLA212 được ký hiệu là "cLA212".

4)-6 Quá trình tinh chế của cLA212

Kháng thể được tinh chế từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được trong Ví dụ 4)-5 bằng sắc ký ái lực rProtein (ở 4 đến 6°C). Bước thay chất đệm sau quá trình tinh chế sắc ký ái lực rProtein được thực hiện ở 4 đến 6°C. Đầu tiên, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng cho cột được nạp đầy với MabSelectSuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare) được làm cân bằng với PBS. Sau khi nạp toàn bộ dung dịch môi trường nuôi cấy vào trong cột, cột được rửa với PBS trong lượng ít nhất hai lần thể tích cột. Tiếp theo, phân đoạn chứa kháng thể được thu gom bằng cách rửa giải với dung dịch arginin hydroclorua 2 M (pH 4,0). Phân đoạn được thay bằng đệm HBSor (25 mM histidin và 5% sorbitol, pH 6,0) bằng cách thẩm tách (Thermo Fisher Scientific Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette). Sau cùng, phân đoạn được cô và được điều chỉnh đến nồng độ IgG 25 mg/ml hoặc cao hơn bằng cách sử dụng thiết bị Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN 20 (trọng lượng phân tử trên danh nghĩa:

UF10K, Sartorius AG, ở 4°C), và được sử dụng như mẫu được tinh chế. Sau cùng, lọc với bộ lọc Minisart-Plus (Sartorius AG) được thực hiện để tạo ra mẫu được tinh chế.

4)-7 Hoạt tính liên kết kháng nguyên của kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 (cLA212)

Plasmid biểu hiện pcADN3.1-hLAG-3 của LAG-3 ở người được bổ sung vào trong tế bào 293T-lacZ (được mô tả trong Ví dụ 1)-5-1), bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000 (được sản xuất bởi Invitrogen Corp.), và tế bào được nuôi cấy trong 1 ngày và sau đó được sử dụng cho phương pháp đếm tế bào theo dòng. Phương pháp đếm tế bào theo dòng được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1)-4, ngoại trừ thể liên hợp kháng IgG PE ở người (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) được pha loãng 200 lần với chất đệm FACS được sử dụng làm kháng thể thứ cấp. Như được thể hiện trong Fig. 6, nó cho thấy rằng kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 cLA212 được liên kết với tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người theo cách phụ thuộc vào nồng độ và do đó cũng duy trì hoạt tính liên kết sau quá trình khảm.

Ví dụ 5. Thiết kế dạng được nhân hóa (hLA212) của kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người (rLA212)

5-1 Thiết kế kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người rLA212 được nhân hóa

5)-1-1 Tạo mẫu phân tử của vùng biến đổi rLA212

Việc tạo mẫu phân tử của vùng biến đổi rLA212 được thực hiện bằng phương pháp đã biết như tạo mẫu đồng nhất (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Vùng biến đổi của rLA212 được xác định trong Ví dụ 3)-2 được so với trình tự ban đầu (cấu trúc ba chiều được tạo ra từ cấu trúc tinh thể tia X là có sẵn) của vùng biến đổi globulin miễn dịch người vùng biến đổi globulin miễn dịch người được đăng ký trong Ngân hàng dữ liệu protein Protein Data Bank (Nuc.Axit Res.35,D301-D303 (2007)). Kết quả là, 2GHW và 2ARJ được chọn làm có tính tương đồng trình tự cao nhất đối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ của rLA212. Cấu trúc ba chiều của vùng bộ khung được tạo ra bằng cách thu "mẫu bộ khung" bằng cách kết hợp phối trí của 2GHW và 2ARJ tương ứng với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của rLA212. Sau đó, hình dạng đặc thù của CDR được kết hợp trong mẫu bộ khung. Sau cùng, việc xác định

năng lượng để loại trừ sự tiếp hợp bất lợi giữa các nguyên tử được thực hiện để thu được mẫu phân tử có thể có của vùng biến đổi rLA212 thông qua năng lượng. Quá trình này được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình phân tích cấu trúc protein program Discovery Studio có bán sẵn trên thị trường (được sản xuất bởi Accelrys, Inc).

5)-1-2 Thiết kế trình tự axit amin của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212

Kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212 được tạo cấu trúc bằng phương pháp đã biết như ghép CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Kháng thể nhận được chọn trên cơ sở của độ tương đồng của axit amin trong vùng bộ khung.

Trình tự của vùng bộ khung của rLA212 so với vùng bộ khung của trình tự liên ứng của tiểu nhóm ở người và trình tự Germlin được xác định trong KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Kết quả là, trình tự liên ứng của tiểu nhóm chuỗi gamma ở người 3 đối với chuỗi nặng và trình tự liên ứng của tiểu nhóm chuỗi kappa ở người 1 đối với chuỗi nhẹ được chọn lần lượt làm trình tự nhận do có high độ tương đồng về trình tự trong vùng bộ khung. Gốc axit amin trong vùng bộ khung đối với trình tự nhận được sắp xếp thẳng hàng với gốc axit amin đối với rLA212 để xác định vị trí trong đó axit amin khác được sử dụng. Vị trí của các gốc này được phân tích bằng cách sử dụng mẫu ba chiều của rLA212 được tạo cấu trúc trong Ví dụ 5)-1-1. Sau đó, gốc cho được ghép trên trình tự nhận được chọn theo tiêu chuẩn được mô tả bởi Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Do đó, một số gốc cho được chọn được chuyển vào kháng thể nhận để tạo cấu trúc trình tự hLA212 được nhân hóa như được mô tả trong Ví dụ sau đây.

5)-2 Nhân hóa chuỗi nặng rLA212

5)-2-1 Chuỗi nặng loại hLA212_H2 được nhân hóa

Chuỗi nặng hLA212 được nhân hóa được thiết kế bằng cách thế arginin ở vị trí axit amin 16 với glyxin, lysin ở vị trí axit amin 19 với arginin, threonin ở vị trí axit amin 42 với glyxin, arginin ở vị trí axit amin 43 với lysin, alanin ở vị trí axit amin 49 với glyxin, axit aspartic ở vị trí axit amin 84 với asparagin, serin ở vị trí axit amin 88

với alanin, threonin ở vị trí axit amin 93 với valin, valin ở vị trí axit amin 115 với threonin, và methionin ở vị trí axit amin 116 với leuxin, trong vùng biến đổi chuỗi nặng của cLA212 dạng khả được thể hiện trong SEQ ID No: 24 được ký hiệu là "chuỗi nặng loại hLA212_H2 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H2").

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại hLA212_H2 được nhân hóa được mô tả trong SEQ ID No: 28 của Danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin của SEQ ID No: 28, trình tự bao gồm gốc axit amin 1 đến 19, trình tự bao gồm gốc axit amin 20 đến 140, và trình tự bao gồm gốc axit amin 141 đến 470 lần lượt tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng hằng định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID No: 28 được mô tả trong SEQ ID No: 27 của Danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit của SEQ ID No: 27, trình tự bao gồm nucleotit 1 đến 57, trình tự bao gồm nucleotit 58 đến 420, và trình tự bao gồm nucleotit 421 đến 1410 lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, vùng biến đổi trình tự chuỗi nặng, và vùng hằng định trình tự chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID No: 27 và trình tự axit amin của SEQ ID No: 28 cũng lần lượt được mô tả trong các Fig. 42 và 43.

5)-2-2 Chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa

Chuỗi nặng hLA212 được nhân hóa được thiết kế bằng cách thế arginin ở vị trí axit amin 16 với glyxin, lysin ở vị trí axit amin 19 với arginin, threonin ở vị trí axit amin 42 với glyxin, arginin ở vị trí axit amin 43 với lysin, serin ở vị trí axit amin 88 với alanin, threonin ở vị trí axit amin 93 với valin, valin ở vị trí axit amin 115 với threonin, và methionin ở vị trí axit amin 116 với leuxin, trong vùng biến đổi chuỗi nặng của cLA212 dạng khả được thể hiện trong SEQ ID No: 24 được ký hiệu là "chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H3").

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa được mô tả trong SEQ ID No: 30 của Danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin của SEQ ID No: 30, trình tự bao gồm gốc axit amin 1 đến 19, trình tự bao gồm gốc axit amin 20 đến 140, và trình tự bao gồm gốc axit amin 141 đến 470 lần lượt tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng hằng định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã

hóa trình tự axit amin của SEQ ID No: 30 được mô tả trong SEQ ID No: 29 của Danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit của SEQ ID No: 29, trình tự bao gồm nucleotit 1 đến 57, trình tự bao gồm nucleotit 58 đến 420, và trình tự bao gồm nucleotit 421 đến 1410 lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, vùng biến đổi trình tự chuỗi nặng, và vùng hằng định trình tự chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID No: 29 và trình tự axit amin của SEQ ID No: 30 cũng lần lượt được mô tả trong các Fig. 44 và 45.

5)-3 Nhân hóa chuỗi nhẹ rLA212

5)-3-1 Chuỗi nhẹ loại hLA212_L1 được nhân hóa

Chuỗi nhẹ hLA212 được nhân hóa được thiết kế bằng cách thế asparagin ở vị trí axit amin 1 với axit aspartic, valin ở vị trí axit amin 3 với glutamin, lysin ở vị trí axit amin 9 với serin, methionin ở vị trí axit amin 11 với leuxin, isoleuxin ở vị trí axit amin 13 với alanin, methionin ở vị trí axit amin 21 với isoleuxin, asparagin ở vị trí axit amin 22 với threonin, lysin ở vị trí axit amin 38 với glutamin, serin ở vị trí axit amin 43 với alanin, axit aspartic ở vị trí axit amin 60 với serin, threonin ở vị trí axit amin 63 với serin, glyxin ở vị trí axit amin 65 với serin, tyrosin ở vị trí axit amin 67 với serin, asparagin ở vị trí axit amin 76 với serin, valin ở vị trí axit amin 78 với leuxin, alanin ở vị trí axit amin 80 với prolin, alanin ở vị trí axit amin 83 với phenylalanin, phenylalanin ở vị trí axit amin 85 với threonin, alanin ở vị trí axit amin 100 với glutamin, axit glutamic ở vị trí axit amin 103 với lysin, leuxin ở vị trí axit amin 104 với valin, leuxin ở vị trí axit amin 106 với isoleuxin, và alanin ở vị trí axit amin 109 với threonin, trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của cLA212 dạng khả năng được thể hiện trong SEQ ID No: 26 được ký hiệu là "chuỗi nhẹ loại hLA212_L1 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_L1").

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại hLA212_L1 được nhân hóa được mô tả trong SEQ ID No: 32 của Danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin của SEQ ID No: 32, trình tự bao gồm gốc axit amin 1 đến 20, trình tự bao gồm gốc axit amin 21 đến 129, và trình tự bao gồm gốc axit amin 130 đến 234 lần lượt tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID No: 32 được mô tả trong SEQ ID No: 31 của Danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit của SEQ ID No: 31, trình tự bao gồm nucleotit 1 đến

60, trình tự bao gồm nucleotit 61 đến 387, và trình tự bao gồm nucleotit 388 đến 702 lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, vùng biến đổi trình tự chuỗi nhẹ, và vùng hằng định trình tự chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID No: 31 và trình tự axit amin của SEQ ID No: 32 cũng lần lượt được mô tả trong các Fig. 46 và 47.

5)-3-2 Chuỗi nhẹ loại hLA212_L2 được nhân hóa

Chuỗi nhẹ hLA212 được nhân hóa được thiết kế bằng cách thế asparagin ở vị trí axit amin 1 với axit aspartic, valin ở vị trí axit amin 3 với glutamin, lysin ở vị trí axit amin 9 với serin, methionin ở vị trí axit amin 11 với leuxin, isoleuxin ở vị trí axit amin 13 với alanin, methionin ở vị trí axit amin 21 với isoleuxin, asparagin ở vị trí axit amin 22 với threonin, lysin ở vị trí axit amin 38 với glutamin, axit aspartic ở vị trí axit amin 60 với serin, threonin ở vị trí axit amin 63 với serin, glyxin ở vị trí axit amin 65 với serin, asparagin ở vị trí axit amin 76 với serin, valin ở vị trí axit amin 78 với leuxin, alanin ở vị trí axit amin 80 với prolin, alanin ở vị trí axit amin 83 với phenylalanin, phenylalanin ở vị trí axit amin 85 với threonin, alanin ở vị trí axit amin 100 với glutamin, axit glutamic ở vị trí axit amin 103 với lysin, leuxin ở vị trí axit amin 104 với valin, leuxin ở vị trí axit amin 106 với isoleuxin, và alanin ở vị trí axit amin 109 với threonin, trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của cLA212 dạng khám được thể hiện trong SEQ ID No: 26 được ký hiệu là "chuỗi nhẹ loại hLA212_L2 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_L2").

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại hLA212_L2 được nhân hóa được mô tả trong SEQ ID No: 34 của Danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin của SEQ ID No: 34, trình tự bao gồm gốc axit amin 1 đến 20, trình tự bao gồm gốc axit amin 21 đến 129, và trình tự bao gồm gốc axit amin 130 đến 234 lần lượt tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID No: 34 được mô tả trong SEQ ID No: 33 của Danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit của SEQ ID No: 33, trình tự bao gồm nucleotit 1 đến 60, trình tự bao gồm nucleotit 61 đến 387, và trình tự bao gồm nucleotit 388 đến 702 lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, vùng biến đổi trình tự chuỗi nhẹ, và vùng hằng định trình tự chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID No: 33 và trình tự axit amin của SEQ ID No: 34 cũng lần lượt được mô tả trong các Fig. 48 và 49.

5)-3-3 Chuỗi nhẹ loại hLA212_L3 được nhân hóa

Chuỗi nhẹ hLA212 được nhân hóa được thiết kế bằng cách thế valin ở vị trí axit amin 3 với glutamin, lysin ở vị trí axit amin 9 với serin, methionin ở vị trí axit amin 11 với leuxin, isoleuxin ở vị trí axit amin 13 với alanin, methionin ở vị trí axit amin 21 với isoleuxin, asparagin ở vị trí axit amin 22 với threonin, threonin ở vị trí axit amin 63 với serin, asparagin ở vị trí axit amin 76 với serin, valin ở vị trí axit amin 78 với leuxin, alanin ở vị trí axit amin 80 với prolin, alanin ở vị trí axit amin 83 với phenylalanin, alanin ở vị trí axit amin 100 với glutamin, axit glutamic ở vị trí axit amin 103 với lysin, leuxin ở vị trí axit amin 104 với valin, leuxin ở vị trí axit amin 106 với isoleuxin, và alanin ở vị trí axit amin 109 với threonin, trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của cLA212 dạng khảm được thể hiện trong SEQ ID No: 26 được ký hiệu là "chuỗi nhẹ loại hLA212_L3 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_L3").

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại hLA212_L3 được nhân hóa được mô tả trong SEQ ID No: 36 của Danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin của SEQ ID No: 36, trình tự bao gồm gốc axit amin 1 đến 20, trình tự bao gồm gốc axit amin 21 đến 129, và trình tự bao gồm gốc axit amin 130 đến 234 lần lượt tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID No: 36 được mô tả trong SEQ ID No: 35 của Danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit của SEQ ID No: 35, trình tự bao gồm nucleotit 1 đến 60, trình tự bao gồm nucleotit 61 đến 387, và trình tự bao gồm nucleotit 388 đến 702 lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, vùng biến đổi trình tự chuỗi nhẹ, và vùng hằng định trình tự chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID No: 35 và trình tự axit amin của SEQ ID No: 36 lần lượt được mô tả cũng trong các Fig. 50 và 51.

5)-3-4 Chuỗi nhẹ loại hLA212_L4 được nhân hóa

Chuỗi nhẹ hLA212 được nhân hóa được thiết kế bằng cách thế asparagin ở vị trí axit amin 1 với axit aspartic, valin ở vị trí axit amin 3 với glutamin, lysin ở vị trí axit amin 9 với serin, asparagin ở vị trí axit amin 22 với threonin, axit aspartic ở vị trí axit amin 60 với serin, threonin ở vị trí axit amin 63 với serin, glyxin ở vị trí axit amin 65 với serin, tyrosin ở vị trí axit amin 67 với serin, asparagin ở vị trí axit amin 76 với serin, alanin ở vị trí axit amin 80 với prolin, alanin ở vị trí axit amin 83 với

phenylalanin, phenylalanin ở vị trí axit amin 85 với threonin, alanin ở vị trí axit amin 100 với glutamin, axit glutamic ở vị trí axit amin 103 với lysin, và alanin ở vị trí axit amin 109 với threonin, trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của cLA212 dạng khảm được thể hiện trong SEQ ID No: 26 được ký hiệu là "chuỗi nhẹ loại hLA212_L4 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_L4").

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại hLA212_L4 được nhân hóa được mô tả trong SEQ ID No: 38 của Danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin của SEQ ID No: 38, trình tự bao gồm gốc axit amin 1 đến 20, trình tự bao gồm gốc axit amin 21 đến 129, và trình tự bao gồm gốc axit amin 130 đến 234 lần lượt tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID No: 38 được mô tả trong SEQ ID No: 37 của Danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit của SEQ ID No: 37, trình tự bao gồm nucleotit 1 đến 60, trình tự bao gồm nucleotit 61 đến 387, và trình tự bao gồm nucleotit 388 đến 702 lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, vùng biến đổi trình tự chuỗi nhẹ, và vùng hằng định trình tự chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID No: 37 và trình tự axit amin của SEQ ID No: 38 lần lượt được mô tả cũng trong các Fig. 52 và 53.

5)-3-5 Chuỗi nhẹ loại hLA212_L5 được nhân hóa

Chuỗi nhẹ hLA212 được nhân hóa được thiết kế bằng cách thế valin ở vị trí axit amin 3 với glutamin, lysin ở vị trí axit amin 9 với serin, asparagin ở vị trí axit amin 22 với threonin, threonin ở vị trí axit amin 63 với serin, asparagin ở vị trí axit amin 76 với serin, alanin ở vị trí axit amin 80 với prolin, alanin ở vị trí axit amin 100 với glutamin, axit glutamic ở vị trí axit amin 103 với lysin, và alanin ở vị trí axit amin 109 với threonin, trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của cLA212 dạng khảm được thể hiện trong SEQ ID No: 26 được ký hiệu là "chuỗi nhẹ loại hLA212_L5 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_L5").

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại hLA212_L5 được nhân hóa được mô tả trong SEQ ID No: 40 của Danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin của SEQ ID No: 40, trình tự bao gồm gốc axit amin 1 đến 20, trình tự bao gồm gốc axit amin 21 đến 129, và trình tự bao gồm gốc axit amin 130 đến 234 lần lượt tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa

trình tự axit amin của SEQ ID No: 40 được mô tả trong SEQ ID No: 39 của Danh mục trình tự. Trong trình tự nucleotit của SEQ ID No: 39, trình tự bao gồm nucleotit 1 đến 60, trình tự bao gồm nucleotit 61 đến 387, và trình tự bao gồm nucleotit 388 đến 702 lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, vùng biến đổi trình tự chuỗi nhẹ, và vùng hằng định trình tự chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID No: 39 và trình tự axit amin của SEQ ID No: 40 lần lượt được mô tả cũng trong các Fig. 54 và 55.

5)-4 Thiết kế hLA212 được nhân hóa bằng cách kết hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H2 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L1 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H2/L1 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H2/L1"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H2 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L2 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H2/L2 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H2/L2"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H2 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L3 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H2/L3 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H2/L3"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H2 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L4 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H2/L4 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H2/L4"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H2 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L5 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H2/L5 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H2/L5"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L1 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H3/L1 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H3/L1"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L2 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H3/L2 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H3/L2"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L3 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H3/L3 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H3/L3"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L4 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H3/L4 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H3/L4"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L5 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H3/L5 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H3/L5").

nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L4 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H3/L4 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H3/L4"). Kháng thể bao gồm chuỗi nặng loại hLA212_H3 được nhân hóa và chuỗi nhẹ loại hLA212_L5 được nhân hóa được thiết kế và được ký hiệu là "hLA212_H3/L5 được nhân hóa" (mà có thể còn được gọi là "hLA212_H3/L5"). Kháng thể được thiết kế như trên đây có thể được tạo ra theo Ví dụ 6 và được đánh giá theo Ví dụ 7 và Ví dụ 8.

Ví dụ 6. Sự biểu hiện và quá trình tinh chế của kháng thể được nhân hóa (hLA212) của kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 cLA212

6)-1 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng hLA212

6)-1-1 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng loại hLA212_H2

Mảnh ADN chứa trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của hLA212_H2 được thể hiện trong vị trí nucleotit 36 đến 437 của trình tự nucleotit của hLA212_H2 của SEQ ID No: 27 được tổng hợp (Strings DNA Fragments, Genart AG). Mảnh ADN được tổng hợp được chèn trong vị trí của vector biểu hiện chuỗi nặng loại IgG1 kháng thể khảm và được nhân hóa pCMA-G1 được phân cắt bằng enzym giới hạn BlnI, bằng cách sử dụng kit tạo dòng In-Fusion HD PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.) để tạo cấu trúc vector biểu hiện hLA212_H2. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA/hLA212_H2".

6)-1-2 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nặng loại hLA212_H3

Mảnh ADN chứa trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của hLA212_H2 được thể hiện trong vị trí nucleotit 36 đến 437 của trình tự nucleotit của hLA212_H3 của SEQ ID No: 29 được tổng hợp (Strings DNA Fragments, Genart AG). Theo cách giống như trong Ví dụ 6)-1-1, vector biểu hiện được tạo cấu trúc hLA212_H3. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA/hLA212_H3".

6)-2 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ hLA212

6)-2-1 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ loại hLA212_L1

Mảnh ADN chứa trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của hLA212_L1 được thể hiện trong vị trí nucleotit 37 đến 402 của trình tự nucleotit của hLA212_L1 của SEQ ID No: 31 được tổng hợp (Strings DNA Fragments, Genart AG). Mảnh ADN được tổng hợp được chèn trong vị trí của vector biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được

nhân hóa pCMA-LK được phân cắt bằng enzym giới hạn BsiWI, bằng cách sử dụng kit tạo dòng In-Fusion HD PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.) để tạo cấu trúc vector biểu hiện hLA212_L1. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA/hLA212_L1".

[0285]

6)-2-2 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ loại hLA212_L2

Mảnh ADN chứa trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của hLA212_L2 được thể hiện trong vị trí nucleotit 37 đến 402 của trình tự nucleotit của hLA212_L2 của SEQ ID No: 33 được tổng hợp (Strings DNA Fragments, Genart AG). Theo cách giống như trong Ví dụ 6)-2-1, vector biểu hiện hLA212_L2 được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA/hLA212_L2".

6)-2-3 Tạo cấu trúc hLA212_L3 vector biểu hiện chuỗi nhẹ loại

Mảnh ADN chứa trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của hLA212_L3 được thể hiện trong vị trí nucleotit 37 đến 402 của trình tự nucleotit của hLA212_L3 của SEQ ID No: 35 được tổng hợp (Strings DNA Fragments, Genart AG). Theo cách giống như trong Ví dụ 6)-2-1, vector biểu hiện hLA212_L3 được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA/hLA212_L3".

6)-2-4 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ loại hLA212_L4

Mảnh ADN chứa trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của hLA212_L4 được thể hiện trong vị trí nucleotit 37 đến 402 trong trình tự nucleotit của hLA212_L4 của SEQ ID No: 37 được tổng hợp (Strings DNA Fragments, Genart AG). Theo cách giống như trong Ví dụ 6)-2-1, vector biểu hiện hLA212_L4 được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA/hLA212_L4".

6)-2-5 Tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi nhẹ loại hLA212_L5

Mảnh ADN chứa trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của hLA212_L5 được thể hiện trong vị trí nucleotit 37 đến 402 trong trình tự nucleotit của hLA212_L5 của SEQ ID No: 39 được tổng hợp (Strings DNA Fragments, Genart AG). Theo cách giống như trong Ví dụ 6)-2-1, vector biểu hiện hLA212_L5 được tạo cấu trúc. Vector biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA/hLA212_L5".

6)-3 Quá trình điều chế kháng thể hLA212

6)-3-1 Quá trình sản xuất kháng thể hLA212

Quá trình sản xuất được thực hiện theo cách giống như trong Ví dụ 4)-5, Cụ thể là, hLA212_H2/L1 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H2 và pCMA/hLA212_L1; hLA212_H2/L2 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H2 và pCMA/hLA212_L2; hLA212_H2/L3 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H2 và pCMA/hLA212_L3; hLA212_H2/L4 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H2 và pCMA/hLA212_L4; hLA212_H2/L5 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H2 và pCMA/hLA212_L5; hLA212_H3/L1 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H3 và pCMA/hLA212_L1; hLA212_H3/L2 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H3 và pCMA/hLA212_L2; hLA212_H3/L3 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H3 và pCMA/hLA212_L3; hLA212_H3/L4 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H3 và pCMA/hLA212_L4; và hLA212_H3/L5 thu được bằng kết hợp pCMA/hLA212_H3 và pCMA/hLA212_L5,

6)-3-2 Quá trình tinh chế của kháng thể hLA212

Dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được trong 6)-3-1 được sử dụng để quá trình tinh chế theo cách giống như trong Ví dụ 4)-6,

Ví dụ 7. Quá trình đánh giá in vitro của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa (hLA212)

7)-1 Hoạt tính liên kết kháng nguyên thử nghiệm của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa (hLA212) bằng cách sử dụng Biacore

Tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) được sử dụng để biểu hiện protein được gắn His vào đầu cuối C LAG-3_D3D4-His của vùng thứ ba và thứ tư (vùng của vị trí 263-450) từ đầu cuối N trong số bốn vùng ngoại bào giống globulin miễn dịch của LAG-3 ở người. Dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được được cho thay thế đệm (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, và pH 7,5), để tinh chế protein LAG-3_D3D4-His ở người bằng cách sử dụng cột HisTrap HP (GE Healthcare) và cột Superdex75 (GE Healthcare). Chất đệm cuối là PBS.

Kháng thể được thử nghiệm đối với hằng số phân ly của nó đối với kháng nguyên (LAG-3_D3D4-His) bằng cách sử dụng Biacore T200 (GE Healthcare) bằng phương pháp bắt giữ, mà bao gồm bắt giữ kháng thể làm phối tử với kháng thể kháng

IgG(Fc) ở người được làm cố định (Kit Human Antibody Capture, GE Healthcare) và thử nghiệm với kháng nguyên làm chất được phân tích. Kháng thể kháng IgG(Fc) ở người được liên kết đồng hóa trị với chip cảm biến CM5 (GE Healthcare) bằng liên kết amin, hướng đích khoảng 1000 RU. Tương tự, kháng thể này được làm cố định trên tế bào tham chiếu. Chất đệm được sử dụng là HBS-EP+ (10 mM HEPES (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, và 0,05% chất hoạt động bề mặt P20). Sau khi mỗi kháng thể được bổ sung đối với khoảng 1 phút trên chip được làm cố định bằng kháng thể kháng IgG(Fc) ở người, các dung dịch pha loãng theo dãy (0,06 đến 20 nM) của kháng nguyên được bổ sung vào đó ở tốc độ dòng 90 μ l/phút trong 300 giây, và sau đó pha phân ly được quan sát trong 3600 giây. 3M dung dịch magie clorua được bổ sung vào đó để tạo ra dung dịch ở tốc độ dòng 10 μ l/phút trong 30 giây. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng mẫu liên kết 1:1 trong phần mềm phân tích (Biacore T200 Evaluation Software, version 1,0) để xác định hằng số tốc độ kết hợp k_a , hằng số tốc độ phân ly k_d , và hằng số phân ly ($KD; KD = k_d/k_a$). Fig. 7 thể hiện hằng số phân ly.

7)-2 Nghiên cứu đối với hoạt tính liên kết của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa (hLA212) đối với tế bào biểu hiện LAG-3 ở người bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng

Plasmid biểu hiện LAG-3 ở người pcADN3.1/hLAG-3 được bổ sung vào trong tế bào 293T-lacZ (được mô tả trong Ví dụ 1)-5-1), bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000 (được sản xuất bởi Invitrogen Corp.), và tế bào được nuôi cấy trong 1 ngày và sau đó được sử dụng đối với phương pháp đếm tế bào theo dòng. Phương pháp đếm tế bào theo dòng được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1)-4, nhưng thể liên hợp kháng IgG PE ở người (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) được pha loãng 200 lần với chất đệm FACS được sử dụng làm kháng thể thứ cấp. Như được thể hiện trong Fig. 8, nó cho thấy rằng tất cả 10 dòng vô tính của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa (hLA212_H2/L1, hLA212_H2/L2, hLA212_H2/L3, hLA212_H2/L4, hLA212_H2/L5, hLA212_H3/L1, hLA212_H3/L2, hLA212_H3/L3, hLA212_H3/L4, và hLA212_H3/L5) có hoạt tính liên kết phụ thuộc vào nồng độ với tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người, so với

kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 cLA212, và do đó duy trì hoạt tính liên kết thậm chí sau khi nhân hóa.

[0293]

7)-3 hoạt tính ADCC của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa (hLA212)

Hoạt tính ADCC của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa (hLA212) được nghiên cứu bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2)-2, Như được thể hiện trong Fig. 9, kết quả cho thấy rằng tất cả 10 dòng vô tính của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa (hLA212_H2/L1, hLA212_H2/L2, hLA212_H2/L3, hLA212_H2/L4, hLA212_H2/L5, hLA212_H3/L1, hLA212_H3/L2, hLA212_H3/L3, hLA212_H3/L4, và hLA212_H3/L5) có hoạt tính ADCC phụ thuộc vào nồng độ chống lại tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người, hầu như có thể so với kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 cLA212 và do đó duy trì hoạt tính ADCC thậm chí sau khi nhân hóa.

7)-4 Nghiên cứu đối với ảnh hưởng của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H3/L2 đối với chức năng ức chế tế bào T của LAG-3

LAG-3 được xác định là liên kết với phân tử MHC nhóm II, nhờ đó chuyển một số tín hiệu ức chế đối với tế bào T để điều hòa chức năng tế bào T âm tính (Tài liệu phi sáng chế 1). Đối với liên kết của LAG-3 với phân tử MHC nhóm II, vùng đầu cuối N 1 và 2 của bốn vùng ngoại bào giống globulin miễn dịch của LAG-3 được xem là quan trọng (Tài liệu phi sáng chế 4). Điều này cho thấy rằng trong Ví dụ 2 mà tất cả 5 dòng vô tính của kháng thể chuột kháng LAG-3 ở người (rLA204, rLA212, rLA225, rLA869, và rLA1264) thu được bằng phương pháp của Ví dụ 1 nhận dạng vùng 3 và không có hoạt tính ức chế trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II và thử nghiệm kết dính tế bào 293T-hLAG-3/Raji, trái lại kháng thể người dạng khảm kháng LAG-3 ở người IMP731 mà là kháng thể thông thường trong Tài liệu trích dẫn nhận dạng vùng 1 và có hoạt tính ức chế mạnh trong thử nghiệm liên kết LAG-3/MHC nhóm II và thử nghiệm kết dính tế bào 293T-hLAG-3/Raji. Từ kết quả này, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó thể cho rằng dòng vô tính thu được bằng phương pháp của Ví dụ 1 và kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa được tạo ra từ đó

không ảnh hưởng đối với chức năng ức chế tế bào T trong LAG-3, trái lại IMP731 ức chế nó. Để xác định điều này thông qua thử nghiệm, ảnh hưởng của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H3/L2 đối với chức năng ức chế tế bào T của LAG-3 được nghiên cứu theo thông báo trước đây (Tài liệu phi sáng chế 9). PBMC được tách riêng từ máu ngoại vi người bằng cách ly tâm Ficoll được phân tán trong vi tâm 96 giếng trong lượng 2×10^5 tế bào/giếng, và kháng thể được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách ủ sơ bộ ở 37°C trong 30 phút. Nồng độ IL-2 trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy khi SEB (Staphylococcal Enterotoxin B, được sản xuất bởi Sigma-Aldrich) được bổ sung vào đó đến nồng độ cuối 1 ng/mL, và tế bào được nuôi cấy trong 4 ngày được định lượng bằng kit miễn dịch Human IL-2 Immunoassay Kit (được sản xuất bởi PerkinElmer Inc). Kết quả là, kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H3/L2 được tạo ra hầu như không có ảnh hưởng đối với quá trình sản xuất IL-2, trái lại IMP731 làm tăng sự sản xuất IL-2, như được thể hiện trong Fig. 10. Cụ thể là, như đã được tiên đoán, nó cho thấy rằng kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H3/L2 được tạo ra không có ảnh hưởng đối với chức năng ức chế tế bào T của LAG-3, trái lại IMP731 ức chế nó, nhờ đó có nguy cơ hoạt hóa hệ miễn dịch theo hướng bất lợi.

Ví dụ 8. Quá trình điều chế kháng thể được nhân hóa trong đó sự biến đổi mạch đường của nó được điều chỉnh

Kháng thể được nhân hóa chứa chuỗi nặng chứa các vị trí axit amin 20 đến 470 của trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 30 (Fig. 45) và chuỗi nhẹ chứa các vị trí axit amin 21 đến 234 của trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 34 (Fig. 49) được defucosyl hóa theo phương pháp đã biết, để điều chỉnh sự biến đổi mạch đường liên kết với protein kháng thể, và kháng thể thu được được ký hiệu là hLA212_H4/L2. Dạng được biến đổi này được thực hiện phổ khối. Kết quả là, (các) đỉnh được tạo ra từ chuỗi H bao gồm fucosa bằng với hoặc thấp hơn hơn giới hạn phát hiện. Trong bản mô tả này, kháng thể mà sự biến đổi mạch đường của nó được điều chỉnh, như hLA212_H4/L2, còn được gọi là "kháng thể" hoặc "dạng được biến đổi của kháng thể".

Ví dụ 9. Quá trình đánh giá in vitro của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2

9)-1 Hoạt tính liên kết của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 đối với tế bào biểu hiện LAG-3

Liên kết của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 đối với tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người được nghiên cứu bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 7)-2. Kết quả là, liên kết phụ thuộc vào nồng độ của hLA212_H4/L2 được quan sát, như được thể hiện trong Fig. 11.

9)-2 hoạt tính ADCC in vitro của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2

Hoạt tính ADCC in vitro của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 7)-2. Kết quả là, hLA212_H4/L2 có hoạt tính ADCC phụ thuộc vào nồng độ chống lại tế bào 293T-lacZ biểu hiện LAG-3 ở người, như được thể hiện trong Fig. 12. Ngược lại, nó không có hoạt tính ADCC trên tế bào 293T-lacZ không biểu hiện LAG-3 ở người.

Ví dụ 10. Tạo ra chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người

Kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 được xác định là liên kết với LAG-3 ở người, như được thể hiện trong Ví dụ 9, nhưng không tương tác chéo với LAG-3 của bộ gặm nhấm. Do đó, để có thể thực hiện việc đánh giá in vivo của hLA212_H4/L2, BAC (Nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn) chuột chuyển gen được cho biểu hiện sinh lý học LAG-3 ở người bằng cách sử dụng cơ chế biểu hiện điều hòa của LAG-3 ở chuột được tạo ra. Ngoài ra, FcγRIIIA ở người cần thiết đối với hoạt tính ADCC được nâng cao bằng cách điều chỉnh sự biến đổi mạch đường như trong hLA212_H4/L2 (Junttila, T.T., et al., Cancer Res., Vol.70 (No.11): pp4481-9 (2010)), và do đó BAC chứa gen FcγRIIIA ở người còn được bổ sung vào theo thông báo trước đây (Tài liệu phi sáng chế 10).

10)-1 Tạo cấu trúc vector biểu hiện BAC tái tổ hợp bằng cách sử dụng phản ứng Red/ET

Dòng vô tính BAC tái tổ hợp của LAG-3 ở người RecBAC được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp Red/ET (Zhang Y et al, A new logic for DNA engineering using recombination in E.Coli., Nature 20 (1998) 123-128), mà là phản ứng tái tổ hợp đồng đẳng hoạt hóa trong *Escherichia coli*.

Mỗi dòng vô tính bộ gen BAC, RP11-101F21, và RP23-3001 chứa LAG-3 ở người hoặc vị trí gen LAG-3 ở chuột thu được. Như được thể hiện trong danh mục sau đây, trình tự của intron 5 của gen LAG-3 ở người, trình tự ở cả hai đầu của trình tự AND bộ gen từ codon (mã khởi đầu) khởi đầu quá trình dịch mã codon kết thúc của gen LAG-3 ở người, và đầu 3' và 5' của trình tự bộ gen ADN từ codon khởi đầu quá trình dịch mã đến codon kết thúc của gen LAG-3 của dòng vô tính BAC chuột được sử dụng làm trình tự chính đối với phản ứng tái tổ hợp đồng đẳng hoạt tính trong *Escherichia coli*.

LAG-3-H1: Trình tự near start codon của gen LAG-3 ở người

[5']ATGTGGGAGGCTCAGTTCCTGGGCTTGCTGTTTC[3'] (SEQ ID No: 79)

LAG-3-H2: Trình tự gần codon kết thúc của gen LAG-3 ở người

[5']GCCCGAGCCCGAGCCCGAGCCGGAGCAGCTCTGA[3'] (SEQ ID No: 80)

LAG-3-H3: Rpsl-kan chèn vị trí, chuỗi phụ 5'

[5']GAGTATGTGTTGACTGGTTGATAACTATCG[3'] (SEQ ID No: 81)

LAG-3-H4: Rpsl-kan chèn vị trí, chuỗi phụ

3' [5']GCCATGACAGATTAGCCATGTCTGCAGCAC [3'] (SEQ ID No: 82)

LAG-3-H5: 5'UTR của LAG-3 ở chuột gen

[5']CAGGACCTTTTTCTAACCTCCCTTGAGGGCTGGGGAGGCCCGGGCCAT
AGAGGAG[3'] (SEQ ID No: 83)

LAG-3-H6: 3'UTR của LAG-3 ở chuột gen

[5']CCTGGAGCCGAGGCAGCCAGCAGGTCTCAGCAGCTCCGCCCCGCCGCC
CGCCCCGCC[3'] (SEQ ID No: 84)

Đầu tiên, để chèn nhóm gen đánh dấu chọn lọc dương tính/âm tính (Rpsl-kan) vào trong intron 5 của gen LAG-3 của dòng vô tính BAC ở người, (các)mảnh ADN liên kết trình tự LAG-3-H3, Rpsl-kan, và trình tự LAG-3-H4 trong đoạn liên tiếp (tandem) được tạo cấu trúc bằng PCR bằng cách sử dụng LA-Taq (Takara Bio Inc.)

(mảnh chèn LAG-3 Rpsl-Kan). Dòng vô tính BAC ở người chứa vị trí gen LAG-3 và mảnh chèn LAG-3 Rpsl-Kan được bổ sung vào trong chủng *Escherichia coli* có khả năng phản ứng Red/ET để cảm ứng phản ứng Red/ET trong *Escherichia coli* vật chủ, và cụm đề kháng chloramphenicol và kanamycin được chọn, nhờ đó sàng lọc dòng vô tính BAC tái tổ hợp trong đó mảnh chèn LAG-3 Rpsl-Kan được chèn trong intron 5 của vị trí gen LAG-3 (Sản phẩm trung gian LAG-3 ở người). Sau đó, để dòng vô tính kiểu phụ trình tự ADN bộ gen của gen LAG-3 ở người với Rpsl-kan nhóm gen được chèn vào trong vector plasmit từ sản phẩm trung gian LAG-3 ở người, nhóm gen ADN liên kết H2-H6-SacBpBluescript-H5-H1 trong đoạn liên tiếp được tạo cấu trúc (plasmit tiền chuyển LAG-3). Theo cách giống như trên đây, plasmit tiền chuyển LAG-3 mạch thẳng được bổ sung vào trong chủng *Escherichia coli* có khả năng phản ứng Red/ET cùng với sản phẩm trung gian LAG-3 ở người để cảm ứng phản ứng Red/ET trong *Escherichia coli* vật chủ, và cụm đề kháng ampicillin và kanamycin được chọn, nhờ đó sàng lọc plasmit có trình tự ADN bộ gen của gen LAG-3 ở người với Rpslkan nhóm gen được chèn vào trong đó (plasmit chuyển LAG-3 ở người).

Tiếp theo, trình tự ADN bộ gen của gen LAG-3 ở người có trình tự H5 và trình tự H6 được tạo ra từ trình tự bộ gen chuột ở cả hai đầu với nhóm gen Rpsl-kan được chèn vào trong đó được cắt từ vector plasmit chuyển LAG-3 ở người bằng enzym giới hạn phản ứng (Mảnh chuyển LAG-3 ở người). Theo cách giống như trên đây, (các)mảnh chuyển LAG-3 ở người được bổ sung vào trong chủng *Escherichia coli* có khả năng phản ứng Red/ET, cùng với dòng vô tính LAG-3 BAC ở chuột, để cảm ứng phản ứng Red/ET trong *Escherichia coli* vật chủ, và cụm đề kháng chloramphenicol và kanamycin được chọn, nhờ đó sàng lọc Dòng vô tính BAC tái tổ hợp gen LAG-3 ở chuột/LAG-3 ở người trong đó trình tự ADN bộ gen từ codon bắt đầu dịch mã đến codon kết thúc của LAG-3 ở chuột gen được thay một cách chính xác bằng trình tự ADN bộ gen từ codon bắt đầu dịch mã đến codon kết thúc của mảnh chuyển LAG-3 ở người (Sản phẩm trung gian RecBAC LAG-3 ở chuột/LAG-3 ở người).

Sau cùng, trình tự intron 5 có vị trí gen LAG-3 ở người được khuếch đại bằng PCR và được sử dụng làm trình tự ADN để loại bỏ Rpsl-Kan được chèn trong intron 5 của gen LAG-3 ở người bằng quá trình chọn âm tính (Mảnh sửa chữa LAG-3 ở người).

Theo cách giống như trên đây, (các)mảnh sửa chữa LAG-3 ở người được bổ sung vào trong chủng *Escherichia coli* có khả năng phản ứng Red/ET cùng với Sản phẩm trung gian RecBAC LAG-3 ở chuột/LAG-3 ở người để cảm ứng phản ứng Red/ET trong *Escherichia coli* vật chủ, và cụm đèn kháng chloramphenicol và streptomycin được chọn, nhờ đó tạo cấu trúc dòng vô tính BAC tái tổ hợp gen LAG-3 ở chuột/LAG-3 ở người trong đó trình tự ADN bộ gen từ codon bắt đầu dịch mã đến codon kết thúc của LAG-3 ở chuột gen được thay một cách chính xác bằng trình tự ADN bộ gen của gen LAG-3 ở người từ codon bắt đầu dịch mã đến codon kết thúc (RecBAC LAG-3 ở người). Trình tự ADN bộ gen với H1 đến H6 được kết nối bằng phản ứng Red/ET được kiểm tra bằng cách trình tự phân tích.

10)-2 Quá trình tinh chế của mảnh ADN BAC có độ tinh khiết cao

Tế bào DH10B được biến đổi bằng dòng vô tính BAC tái tổ hợp mà là cấu trúc để biểu hiện gen RecBAC LAG-3 ở người được tạo dòng vô tính trên môi trường thạch aga LB bao gồm chloramphenicol, và một cụm duy nhất được chọn và được nuôi cấy kèm khuấy trong môi trường lỏng cả ngày và đêm.

Dòng vô tính BAC tái tổ hợp RecBAC LAG-3 ở người được tinh chế bằng cách sử dụng kit tách chiết plasmid (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Nucleobond BAC100 kit) theo phương pháp của Abe, et al., với biến đổi một phần (Exp Anim. 2004 53 (4): 311-20. Establishment of an efficient BAC transgenesis protocol and its application to functional characterization of the mouse Brachyury locus. Abe K, Hazama M, kato H, Yamamura K, Suzuki M), sau đó bằng cách bổ sung PI-SceI, nhờ đó cho phép phản ứng ở 37°C trong 16 giờ để tiêu hủy.

Dòng vô tính BAC tái tổ hợp RecBAC LAG-3 ở người mạch thẳng được sử dụng cho 1% gel agarosa SeaKem GTG (Takara Bio Inc.), và quá trình điện di được thực hiện trong điều kiện 6 v/cm, 0,1 đến 40 giây, 15 h, và 14°C bằng cách sử dụng thiết bị điện di trường đẩy (CHEF DR-II, Bio-Rad Laboratories, Inc). Bằng cách hiển thị hóa một phần mẫu làm chỉ thị dẫn hướng bằng cách sử dụng thiết bị chiếu sáng qua mô UV, dòng vô tính BAC tái tổ hợp RecBAC LAG-3 ở người mạch thẳng được tách riêng trong gel agarosa được cắt với dao cạo mà không cần chiếu xạ UV. Mảnh ADN chuỗi dài thu được được chiết từ gel agarosa bằng phương pháp điện giải và được

thẩm tách với chất đệm TE được điều chế cho vi tiêm ở 4°C trong 2 giờ. Mảnh ADN được tinh chế được điện di trường đầy để xác nhận rằng mảnh ADN chuỗi dài được tinh chế ở mức cao mà không bị phân đoạn và xác định nồng độ ADN của nó bằng cách sử dụng quang phổ kế NanoDrop (AGC TECHNO GLASS CO., LTD). Dung dịch của mảnh ADN được pha loãng đến 0,5 ng/μl để điều chế dung dịch của cấu trúc biểu hiện để tạo ra chuột chuyển gen.

10-3) vi tiêm phôi C57BL/6J chuột

PMSG và hCG được sử dụng cho chuột cái C57BL/6J để cảm ứng sự bội rụng trứng, sau đó bằng cách cho giao cấu với chuột đực của cùng chủng, và sau đó trứng được thụ tinh được thu gom.

Bằng cách sử dụng máy vi thao tác, cấu trúc biểu hiện LAG-3 RecBAC ở người/FcγR BAC ở người được tinh chế được tiêm trực tiếp trong nhân của phôi giai đoạn tiền nhân của chuột đực C57BL/6J. Phôi được tiêm ADN được cấy ghép trong ống dẫn trứng của chuột cái được cho thụ thai giả.

10-4) Sàng lọc Southern của con khởi tạo

Dòng con cái thu được bằng quá trình tự sinh đẻ từ trứng được thụ tinh của chuột C57BL/6J với cấu trúc biểu hiện LAG-3 ở người RecBAC/người FcγR BAC được tiêm vào trong đó được nuôi dưỡng đến khi cai sữa. Cá thể tiềm năng là con khởi tạo của chuột chuyển gen LAG-3 ở người RecBAC/ FcγR BAC ở người, được cai sữa ở 3 tuần tuổi và tai được gắn thẻ để xác định cá thể. Sau đó, mô tai được sinh thiết và lưu trữ ở -80°C cho đến khi phân tích.

Mô tai của cá thể tiềm năng của chuột chuyển gen LAG-3 ở người RecBAC/FcγR BAC ở người mà đã được lưu trữ -80°C được làm tan ở nhiệt độ phòng, và chất đệm phân giải bao gồm 1% SDS (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.), 1 mg/ml actinaza E (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) và 0,15 mg/ml proteinaza K (Merck KGaA) được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách lắc ở 55°C trong 16 giờ để làm tan mô. Protein liên kết với bộ gen ADN và được làm tan từ mô được loại bỏ bằng cách chiết với phenol và chiết với phenol/clorofom. ARN được trộn với bộ gen ADN được thoái biến với ARN (Sigma-Aldrich), và sau đó ADN bộ gen dạng polyme được kết tinh bằng cách làm kết tinh trong isopropanol. ADN bộ gen kết tinh

được rửa với 70% etanol, được làm khô bằng không khí, và sau đó được hòa tan lại trong 50 μ l của TE.

Nồng độ ADN của dung dịch ADN bộ gen được điều chế từ mỗi mẫu được xác định bằng phổ hấp thụ, và thể tích của dung dịch ADN bộ gen đương đương với 5 μ g của ADN được tính từ giá trị của nồng độ ADN của mỗi mẫu.

ADN bộ gen được điều chế từ mỗi mẫu, ADN đối chứng dương (ADN bộ gen của chuột đối chứng trong đó cấu trúc biểu hiện được sử dụng đối với vi tiêm được bổ sung), và ADN đối chứng âm (bộ gen ADN của chuột đối chứng), được bổ sung enzym giới hạn, sau đó cho phản ứng ở 37°C trong 16 giờ. Mảnh của ADN bộ gen được tạo ra được kết tinh bằng cách làm kết tinh trong isopropanol, được rửa với 70% etanol, làm khô bằng không khí, và sau đó được hòa tan lại trong TE. Mảnh AND bộ gen được sử dụng cho 1,2% gel agarosa đối với quá trình điện di, và mảnh ADN bộ gen được tách riêng trong gel agarosa được hiển thị hóa bằng cách sử dụng thiết bị chiếu sáng qua mô UV và tạo hình ảnh với thang độ.

Gel agarosa được nhúng trong 0,25N axit clohydric và được lắc nhẹ trong 10 phút. Sau đó, nó còn được nhúng trong 0,4N natri hydroxit và được lắc nhẹ trong 10 phút. Mảnh ADN bộ gen được tách riêng trong gel agarosa được chuyển vào màng nylon (Hybond-XL; GE Healthcare) ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ bằng phương pháp mao dẫn bằng cách sử dụng 0,4N natri hydroxit. Màng nylon với mảnh ADN bộ gen được chuyển vào trong đó được nhúng trong $2 \times$ SSC, được lắc nhẹ trong 10 phút, sau đó làm khô bằng không khí, và được lưu giữ ở nhiệt độ phòng cho đến khi được sử dụng để lai.

Bằng cách sử dụng kit đánh dấu AND (Megaprime DNA Labelling System; GE Healthcare), mảnh ADN được đánh dấu bằng [32P] bằng phương pháp sử dụng đoạn mồi ngẫu nhiên. Bằng cách sử dụng cột quay Sephadex (ProbeQuant G-50 Micro Columns; GE Healthcare), mảnh được đánh dấu bằng [32P] được tinh chế để tạo ra mẫu dò được đánh dấu bằng [32P].

Màng nylon với mảnh ADN bộ gen được chuyển vào trong được đặt trong chất đệm cho quá trình lai, sau đó bằng cách ủ sơ bộ ở 65°C trong 1 giờ. Sau đó, mẫu dò được đánh dấu bằng [32P] được biến tính bằng cách gia nhiệt ở 95°C trong 5 phút và

sản phẩm trung gian được làm mát bằng đá trong 5 phút được bổ sung vào đó, sau đó bằng cách ủ ở 65°C trong 4 giờ. Màng Nylon được loại bỏ sau khi hoàn thành quá trình ủ và được rửa với 0,1% SDS và $0,5 \times$ SSC ở 65°C trong khoảng 15 phút. Độ phóng xạ được tạo ra từ mẫu dò được liên kết với màng được quan sát với máy đo khảo sát, và việc rửa được lặp lại cho đến khi độ phóng xạ gần như không thay đổi.

Màng được rửa được thu hồi với Saran Wrap, được tách lớp với màng tia X (BioMax MS; Eastman Kodak Company) trong phòng tối, và được đặt trong nhóm gen tự chụp bằng tia phóng xạ. Sau khi tiếp xúc ở 4°C trong 1 tuần, màng tia X được tạo ra. Tín hiệu đặc hiệu được tạo ra từ cấu trúc biểu hiện LAG-3 ở người RecBAC/FcγR BAC ở người được phát hiện bằng cách tự chụp bằng tia phóng xạ, và cá thể tạo ra tín hiệu đặc hiệu đối với quá trình lai với mẫu dò được đánh dấu bằng [32P] được xác định là cá thể khởi tạo của chuột chuyển gen LAG-3 ở người RecBAC/FcγR BAC ở người.

10-5) Tạo ra và phát triển chuột F1

Động vật dòng con cái của cá thể khởi tạo thu được và được xác định kiểu hình gen để thu được dòng chuột Tg được thiết lập. Chuột khởi tạo Tg được xác định bằng phân tích Southern và chuột loại đại C57BL/6J in vitro được thụ tinh hoặc tự giao phối để tạo ra cá thể F1. Dòng được tạo ra, trong đó việc chuyển gen đến cá thể F1 được xác định bằng cách xác định kiểu hình gen, được tăng sinh bằng cách thụ tinh in vitro hoặc cho giao phối tự nhiên với chuột lai đại C57BL/6J, và chuột với cả LAG-3 ở người và người FcγRIIIA ở người được bổ sung dị hợp tử vào trong đó, mà được xác định bằng cách xác định kiểu, được sử dụng đối với thử nghiệm.

10-6) Xác định kiểu hình gen chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người

Sự biểu hiện của gen được bổ sung vào trong chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người thu được được nghiên cứu bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Máu ngoại vi được thu gom từ ven đuôi của mỗi chuột trong mao quản hồng cầu được heparin hóa, và tế bào máu đỏ được làm tan bằng PharmLyse (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company) đối với tế bào máu trắng thu được. Tế bào máu trắng được sử dụng một phần với sự biểu hiện phân tích của người FcγRIIIA ở người bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng, và phần còn lại được kích thích trong 3 ngày

với môi trường bao gồm 2 $\mu\text{g/mL}$ Concanavalin (Con A: Sigma-Aldrich) để cảm ứng sự biểu hiện của LAG-3 đối với tế bào T được hoạt hóa thu được. Tế bào này được bổ sung kháng thể kháng LAG-3 ở chuột được đánh dấu PE (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company), kháng thể kháng LAG-3 ở người được đánh dấu ATTO647 (được sản xuất bởi Enzo Life Sciences, Inc.), kháng thể kháng CD3 ở chuột được đánh dấu FITC (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company), và thuốc nhuộm phản ứng huỳnh quang LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit-near-IR (được sản xuất bởi Invitrogen Corp.) để tạo huyền phù, sau đó để yên ở 4°C trong 30 phút. Đối với sử dụng để xác định vị trí của quần thể âm tính, đối chứng không có kháng thể kháng LAG-3 ở chuột được đánh dấu PE và kháng thể kháng LAG-3 ở người được đánh dấu ATTO647 cũng được điều chế và được xử lý theo cùng cách. Sau khi rửa với chất đệm FACS, tế bào được phân tán lại trong PBS bao gồm 1% paraformaldehyt, sau đó bằng cách phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng (CantoII: được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị FlowJo (được sản xuất bởi Tree Star Inc). Sau khi loại bỏ tế bào chết dương tính với thuốc nhuộm phản ứng huỳnh quang LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit-near-IR bằng cách khoanh vùng, tế bào sống sót được phân tích. Kết quả là, chỉ có sự biểu hiện của LAG-3 ở chuột, và không có sự biểu hiện của LAG-3 ở người trên tế bào T được hoạt hóa Con A được tạo ra từ chuột loại đại đối chứng, trái lại sự biểu hiện của cả LAG-3 ở chuột và LAG-3 ở người đều được xác định trên tế bào T được hoạt hóa Con A được tạo ra từ chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/Fc γ RIIIA ở người, và các chấm nhỏ trong đồ thị chấm nhỏ thể hiện tế bào cá thể được phân bố hầu như theo đường chéo, như được thể hiện trong Fig. 13. Hầu như không sự biểu hiện của cả LAG-3 ở chuột và LAG-3 ở người trong tế bào T nghỉ mà không được hoạt hóa. Kết quả này cho thấy rằng, trong chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/Fc γ RIIIA ở người được tạo ra, LAG-3 ở người được biểu hiện theo cách biểu hiện nội sinh của LAG-3 ở chuột, như kế hoạch ban đầu đặt ra, bằng cách sử dụng phương pháp chuyển gen BAC. Ngoài ra, đối với Fc γ RIIIA ở người, kết quả tương đồng so với thông báo trước đây (Tài liệu phi sáng chế 10) được xác định, trong đó sự biểu hiện được quan

sát trên khoảng 47% tế bào NK máu ngoại vi (CD3⁺DX5⁺) của chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người được tạo ra.

Ví dụ 11. Đánh giá in vivo của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2

11-1) hoạt tính làm thiếu hụt tế bào dương tính với LAG-3 của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2

Bằng cách sử dụng chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người của Ví dụ 10, quá trình này nghiên cứu việc liệu kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 thu được có hoạt tính làm thiếu hụt tế bào dương tính với LAG-3 in vivo. Ngay sau khi kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 (30 mg/kg) hoặc dung môi được sử dụng trong bụng chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người, Con A (được sản xuất bởi Sigma-Aldrich) có hoạt tính hoạt hóa tế bào T đa dòng được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 15 mg/kg. Tế bào máu đỏ được làm tan từ máu được thu gom 2 ngày sau đó với PharmLyse (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company) đối với tế bào máu trắng thu được, và tế bào máu trắng được sử dụng đối với phương pháp đếm tế bào theo dòng. Tế bào máu trắng được cho phản ứng với FcBlock (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company), và sau đó kháng thể kháng LAG-3 ở chuột được đánh dấu PE (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company), kháng thể kháng LAG-3 ở người được đánh dấu ATTO647 (được sản xuất bởi Enzo Life Sciences, Inc.), kháng thể kháng chuột CD3 được đánh dấu FITC (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company), và thuốc nhuộm phản ứng huỳnh quang LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit-near-IR (được sản xuất bởi Invitrogen Corp.) được bổ sung vào đó để tạo huyền phù, sau đó để yên ở 4°C trong 30 phút. Đối với việc sử dụng để xác định vị trí quần thể âm tính, đối chứng không có kháng thể kháng LAG-3 ở chuột được đánh dấu PE và kháng thể kháng LAG-3 ở người được đánh dấu ATTO647 cũng được điều chế và được xử lý theo cùng cách. Sau khi rửa với chất đệm FACS, tế bào được phân tán lại trong PBS bao gồm 1% paraformaldehyt, sau đó bằng cách phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng (CantoII: được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng FlowJo (được sản xuất bởi Tree

Star Inc). Sau khi loại bỏ tế bào chết dương tính với thuốc nhuộm phản ứng huỳnh quang LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit-near-IR bằng cách khoanh vùng, tế bào sống sót được phân tích. Đối với kết quả tính mức dương tính LAG-3 ở người trong tế bào T dương tính CD3, như được thể hiện trong Fig. 14, hầu như không có tế bào dương tính với LAG-3 ở người trong tế bào T máu ngoại vi của chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/Fc γ RIIIA ở người không được xử lý, trái lại trung bình 24% tế bào T máu ngoại vi trong nhóm không sử dụng kháng thể trở nên dương tính đối với LAG-3 ở người bằng cách sử dụng của Con A có hoạt tính hoạt hóa tế bào T đa dòng. Ngược lại, mức dương tính LAG-3 ở người trong tế bào T máu ngoại vi của chuột được sử dụng Con A trong đó hLA212_H4/L2 được sử dụng giảm một cách đáng kể. Xu hướng tương tự được quan sát trong tế bào T lá lách và trong tế bào T máu ngoại vi thu được một ngày sau khi sử dụng Con A, và kết quả tương tự cũng thu được đối với mức dương tính đối với LAG-3 ở chuột và CD69 mà là chất chỉ thị hoạt hóa khác. Kết quả này cho thấy rằng kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 thu được có hoạt tính làm thiếu hụt tế bào dương tính với LAG-3 in vivo.

11-2) Hoạt tính của kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 trên mẫu bệnh tự miễn phụ thuộc tế bào T

Để xác định việc liệu kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 có hoạt tính làm thiếu hụt tế bào dương tính với LAG-3 in vivo hữu dụng để điều trị các bệnh tự miễn, hiệu quả chống lại mẫu EAE (viêm não tủy tự miễn thử nghiệm) (Tài liệu phi sáng chế 11) mà là mẫu bệnh tự miễn phụ thuộc tế bào T (đa xơ cứng) được nghiên cứu.

Dung dịch thu được bằng cách hòa tan peptit (axit amin 35-55, PEPTIT INSTITUT, INC.) được tạo ra từ MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) mà là một của trong số các protein cấu thành myelin thần kinh trung ương trong nước muối thường ở nồng độ của 4 mg/mL được trộn với 8 mg/mL hỗn hợp của vi khuẩn Killed Mycobacteri Tuberculosis H37Ra (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company)and tá chất Freund không hoàn chỉnh (được sản xuất bởi Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) trong lượng bằng để tạo ra nhũ tương. Nhũ tương này được

tiêm dưới da vào ngày 0 trong cả hai sườn của chuột chuyển gen kép LAG-3 ở người/FcγRIIIA ở người trong mỗi lượng 50 μL, và 0,2 μg của pertussis toxin (độc tố ho gà) được pha loãng với nước muối thường còn được sử dụng trong tĩnh mạch, để cảm ứng EAE. Sau đó, thang điểm lâm sàng của EAE được quan sát hàng ngày như sau. Cụ thể là, Điểm 0: Không triệu chứng; Điểm 1: Di khập khiễng; Điểm 2: Dáng đi bất thường và mất phản xạ uốn; Điểm 3: Bại chân sau; Điểm 4: Liệt một phần của chân trước; và Điểm 5: Chết hoặc làm chết nhân đạo. Kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 và kháng thể đối chứng được sử dụng trong tĩnh mạch ở mỗi liều 30 mg/kg vào ngày 0 và 7. Kết quả là, trung bình của thang điểm lâm sàng EAE trong nhóm được sử dụng kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 bị ức chế đến 50% hoặc ít hơn trong thời gian quan sát, so với mức trong nhóm được sử dụng kháng thể đối chứng, như được thể hiện trong Fig. 15. Ngoài ra, nhóm trong được sử dụng hLA212_H4/L2, sự giảm thể trọng với sự tiến triển EAE cũng được ức chế. Kết quả này cho thấy rằng kháng thể kháng LAG-3 ở người được nhân hóa hLA212_H4/L2 có hoạt tính làm thiếu hụt tế bào dương tính với LAG-3 in vivo ức chế EAE mà là mẫu bệnh tự miễn phụ thuộc tế bào T điển hình, và có thể là thuốc điều trị đối với các bệnh tự miễn ở người.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Kháng thể, mảnh liên kết của nó, và tương tự theo sáng chế hữu dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh liên quan đối với tế bào dương tính với LAG-3 như các bệnh tự miễn.

Danh mục trình tự

SEQ ID No: 1: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA204 (Fig. 16)

SEQ ID No: 2: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA204 (Fig. 17)

SEQ ID No: 3: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA204 (Fig. 18)

- SEQ ID No: 4: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA204 (Fig. 19)
- SEQ ID No: 5: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA212 (Fig. 20)
- SEQ ID No: 6: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA212 (Fig. 21)
- SEQ ID No: 7: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA212 (Fig. 22)
- SEQ ID No: 8: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA212 (Fig. 23)
- SEQ ID No: 9: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA225 (Fig. 24)
- SEQ ID No: 10: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA225 (Fig. 25)
- SEQ ID No: 11: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA225 (Fig. 26)
- SEQ ID No: 12: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA225 (Fig. 27)
- SEQ ID No: 13: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA869 (Fig. 28)
- SEQ ID No: 14: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA869 (Fig. 29)
- SEQ ID No: 15: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA869 (Fig. 30)
- SEQ ID No: 16: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA869 (Fig. 31)
- SEQ ID No: 17: Trình tự nucleotit của cADN mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA1264 (Fig. 32)
- SEQ ID No: 18: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể rLA1264 (Fig. 33)

- SEQ ID No: 19: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA1264 (Fig. 34)
- SEQ ID No: 20: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể rLA1264 (Fig. 35)
- SEQ ID No: 21: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của tín hiệu tiết chuỗi nhẹ ở người và người k chuỗi vùng hằng định (Fig. 36)
- SEQ ID No: 22: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của tín hiệu tiết chuỗi nặng ở người và vùng hằng định IgG1 ở người (Fig. 37)
- SEQ ID No: 23: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể cLA212 (Fig. 38)
- SEQ ID No: 24: Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể cLA212 (Fig. 39)
- SEQ ID No: 25: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể cLA212 (Fig. 40)
- SEQ ID No: 26: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể cLA212 (Fig. 41)
- SEQ ID No: 27: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng H2 của kháng thể hLA212 (Fig. 42)
- SEQ ID No: 28: Trình tự axit amin của chuỗi nặng H2 của kháng thể hLA212 (Fig. 43)
- SEQ ID No: 29: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nặng H3 của kháng thể hLA212 (Fig. 44)
- SEQ ID No: 30: Trình tự axit amin của chuỗi nặng H3 của kháng thể hLA212 (Fig. 45)
- SEQ ID No: 31: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L1 của kháng thể hLA212 (Fig. 46)
- SEQ ID No: 32: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L1 của kháng thể hLA212 (Fig. 47)
- SEQ ID No: 33: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L2 của kháng thể hLA212 (Fig. 48)
- SEQ ID No: 34: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L2 của kháng thể hLA212 (Fig. 49)
- SEQ ID No: 35: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L3 của kháng thể hLA212 (Fig. 50)

- SEQ ID No: 36: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L3 của kháng thể hLA212 (Fig. 51)
- SEQ ID No: 37: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L4 của kháng thể hLA212 (Fig. 52)
- SEQ ID No: 38: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L4 của kháng thể hLA212 (Fig. 53)
- SEQ ID No: 39: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L5 của kháng thể hLA212 (Fig. 54)
- SEQ ID No: 40: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ L5 của kháng thể hLA212 (Fig. 55)
- SEQ ID No: 41: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA204 (Fig. 56)
- SEQ ID No: 42: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA204 (Fig. 57)
- SEQ ID No: 43: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA204 (Fig. 58)
- SEQ ID No: 44: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA204 (Fig. 59)
- SEQ ID No: 45: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA204 (Fig. 60)
- SEQ ID No: 46: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA204 (Fig. 61)
- SEQ ID No: 47: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA212 (Fig. 62)
- SEQ ID No: 48: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA212 (Fig. 63)
- SEQ ID No: 49: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA212 (Fig. 64)
- SEQ ID No: 50: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA212 (Fig. 65)
- SEQ ID No: 51: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA212 (Fig. 66)

SEQ ID No: 52: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA212 (Fig. 67)

SEQ ID No: 53: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA225 (Fig. 68)

SEQ ID No: 54: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA225 (Fig. 69)

SEQ ID No: 55: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA225 (Fig. 70)

SEQ ID No: 56: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA225 (Fig. 71)

SEQ ID No: 57: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA225 (Fig. 72)

SEQ ID No: 58: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA225 (Fig. 73)

SEQ ID No: 59: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA869 (Fig. 74)

SEQ ID No: 60: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA869 (Fig. 75)

SEQ ID No: 61: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA869 (Fig. 76)

SEQ ID No: 62: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA869 (Fig. 77)

SEQ ID No: 63: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA869 (Fig. 78)

SEQ ID No: 64: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA869 (Fig. 79)

SEQ ID No: 65: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH1 của kháng thể rLA1264 (Fig. 80)

SEQ ID No: 66: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH2 của kháng thể rLA1264 (Fig. 81)

SEQ ID No: 67: Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRH3 của kháng thể rLA1264 (Fig. 82)

SEQ ID No: 68: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL1 của kháng thể rLA1264 (Fig. 83)

SEQ ID No: 69: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL2 của kháng thể rLA1264 (Fig. 84)

SEQ ID No: 70: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ CDRL3 của kháng thể rLA1264 (Fig. 85)

SEQ ID No: 71: Đoạn môi RG2AR3 (Fig. 86)

SEQ ID No: 72: Đoạn môi RKR5 (Fig. 87)

SEQ ID No: 73: Đoạn môi 3,3-F1 (Fig. 88)

SEQ ID No: 74: Đoạn môi 3,3-R1 (Fig. 89)

SEQ ID No: 75: Đoạn môi 212H-F (Fig. 90)

SEQ ID No: 76: Đoạn môi 212H-R (Fig. 91)

SEQ ID No: 77: Đoạn môi 212L-F (Fig. 92)

SEQ ID No: 78: Đoạn môi 212L-R (Fig. 93)

SEQ ID No: 79: Oligonucleotit LAG-3-H1 (Fig. 94)

SEQ ID No: 80: Oligonucleotit LAG-3-H2 (Fig. 95)

SEQ ID No: 81: Oligonucleotit LAG-3-H3 (Fig. 96)

SEQ ID No: 82: Oligonucleotit LAG-3-H4 (Fig. 97)

SEQ ID No: 83: Oligonucleotit LAG-3-H5 (Fig. 98)

SEQ ID No: 84: Oligonucleotit LAG-3-H6 (Fig. 99)

SEQ ID No: 85: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của LAG-3 ở người (Fig. 100)

SEQ ID No: 86: Trình tự axit amin của LAG-3 ở người (Fig. 101)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa:

chuỗi nặng chứa CDRH1 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 47, CDRH2 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 48, và CDRH3 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 49, và

chuỗi nhẹ chứa CDRL1 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 50, CDRL2 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 51 và CDRL3 có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID No: 52,

trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LAG-3 người.

2. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

3. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa ít nhất 95% độ tương đồng với axit amin 20 đến axit amin 140 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 28 và 30, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chứa ít nhất 95% độ tương đồng với axit amin 21 đến axit amin 129 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 32, 34, 36, 38, và 40.

4. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa axit amin 20 đến axit amin 140 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 28 và 30, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chuỗi nhẹ chứa axit amin 21 đến axit amin 129 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 32, 34, 36, 38, và 40.

5. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm gồm có từ [i] đến [x] sau đây:

[i] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 34;

[ii] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 32;

[iii] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 36;

[iv] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 34;

[v] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 36;

[vi] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 38;

[vii] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 40;

[viii] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 32;

[ix] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 38; và

[x] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 140 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 129 của SEQ ID No: 40.

6. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, chứa:

chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm axit amin 20 đến axit amin 470 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID No: 28 và 30, và

chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm axit amin 21 đến axit amin 234 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID No: 32, 34, 36, 38, và 40.

7. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm gồm có từ [i] đến [x] dưới đây:

[i] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 34;

[ii] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 32;

[iii] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 36;

[iv] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 và

chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 34;

[v] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 36;

[vi] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 38;

[vii] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 40;

[viii] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 32;

[ix] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 38; và

[x] kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 40.

8. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự

axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 34.

9. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 32.

10. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 36.

11. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID No: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID No: 40.

12. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là ở dạng fucoza thấp.

13. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó không có gốc lysin ở đầu cuối cacboxy.

14. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

15. Phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.

16. Phân tử axit nucleic theo điểm 15, chứa:

trình tự axit nucleic chứa nucleotit 58 đến nucleotit 420 của trình tự được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 27 và 29, mà mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa axit amin 20 đến axit amin 140 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 28 và 30, tương ứng, và

trình tự axit nucleic chứa nucleotit 61 đến nucleotit 387 của trình tự được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 31, 33, 35, 37, và 39, mà mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa axit amin 21 đến axit amin 129 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 32, 34, 36, 38, và 40, tương ứng.

17. Phân tử axit nucleic theo điểm 15, chứa:

trình tự axit nucleic chứa nucleotit 58 đến nucleotit 1410 của trình tự được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 27 và 29, mà mã hóa chuỗi nặng chứa axit amin 20 đến axit amin 470 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 28 và 30, tương ứng, và

trình tự axit nucleic chứa nucleotit 61 đến nucleotit 702 của trình tự được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 31, 33, 35, 37, và 39, mà mã hóa chuỗi nhẹ chứa axit amin 21 đến axit amin 234 của trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID No: 32, 34, 36, 38, và 40, tương ứng.

18. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa axit amin 20 đến axit amin 140 của trình tự axit amin SEQ ID No: 30, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chứa axit amin 21 đến axit amin 129 của trình tự axit amin SEQ ID No: 34.

19. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 18, chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các trình tự axit amin 20 đến 470 của SEQ ID NO: 30 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID NO: 34.

20. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 18, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là ở dạng fucoza thấp.

21. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 18, trong đó chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó không có gốc lysin ở đầu cuối cacboxy.

22. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo điểm 18 và chất mang dược dụng.

23. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa axit amin 20 đến axit amin 140 của trình tự axit amin SEQ ID No: 28, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chứa axit amin 21 đến axit amin 129 của trình tự axit amin SEQ ID No: 32.

24. Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo điểm 23, chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 20 đến 470 của SEQ ID NO: 28 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các vị trí axit amin 21 đến 234 của SEQ ID NO: 32.

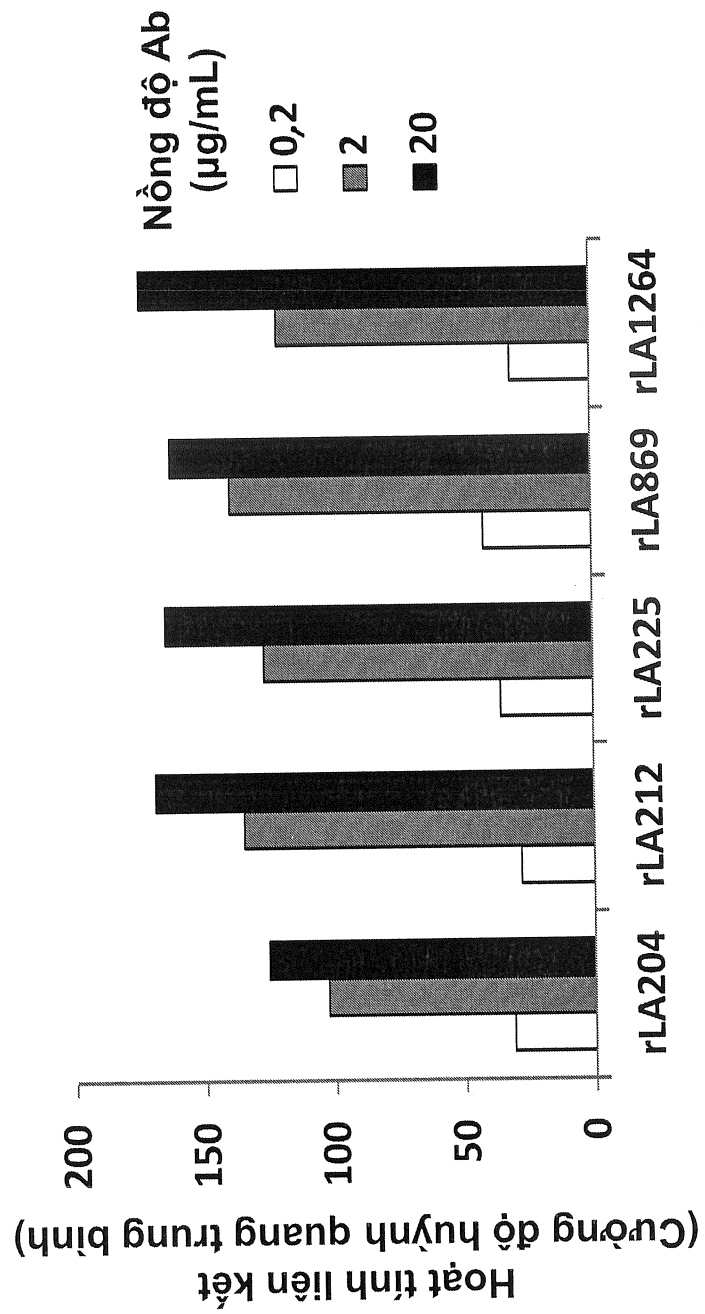
25. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 23, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là ở dạng fucoza thấp.

26. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 23, trong đó chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó không có gốc lysin ở đầu cuối cacboxy.

27. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo điểm 23 và chất mang dược dụng.

1/33

Fig. 1



2/33

Fig. 2

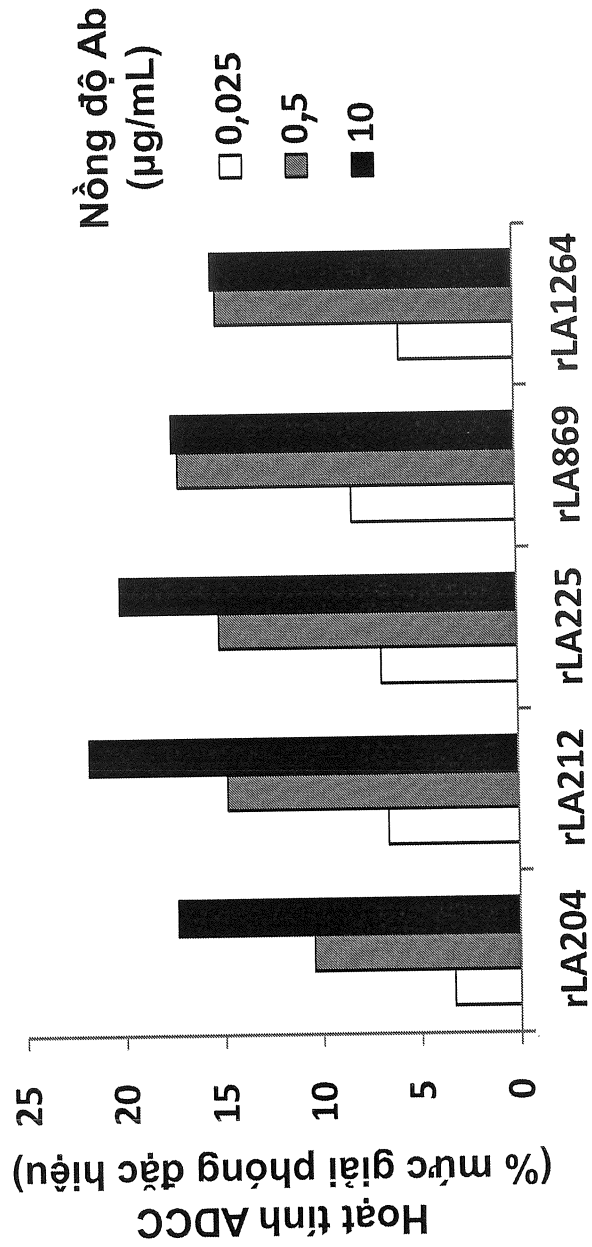
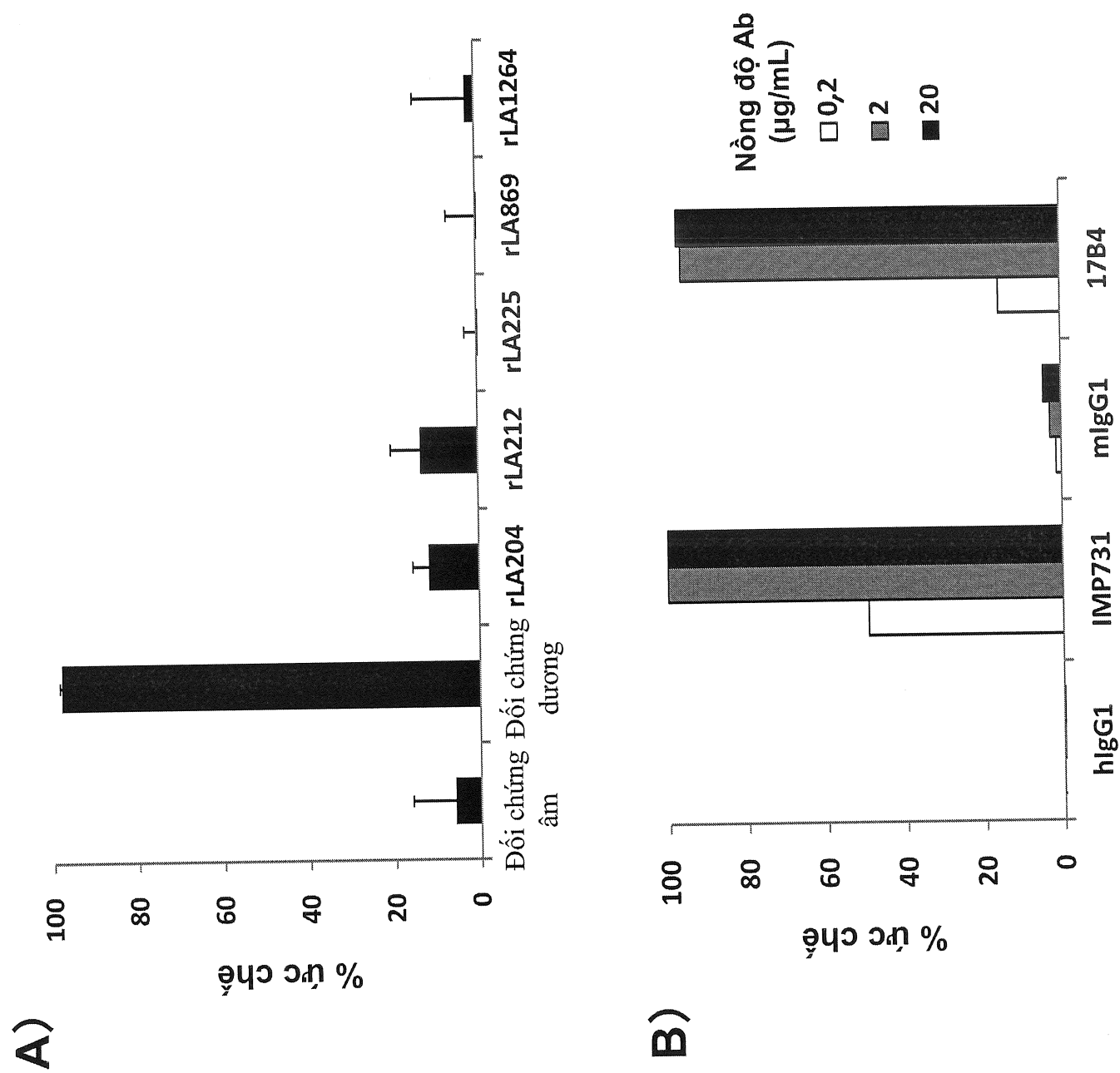


Fig. 3



4/33

Fig. 4

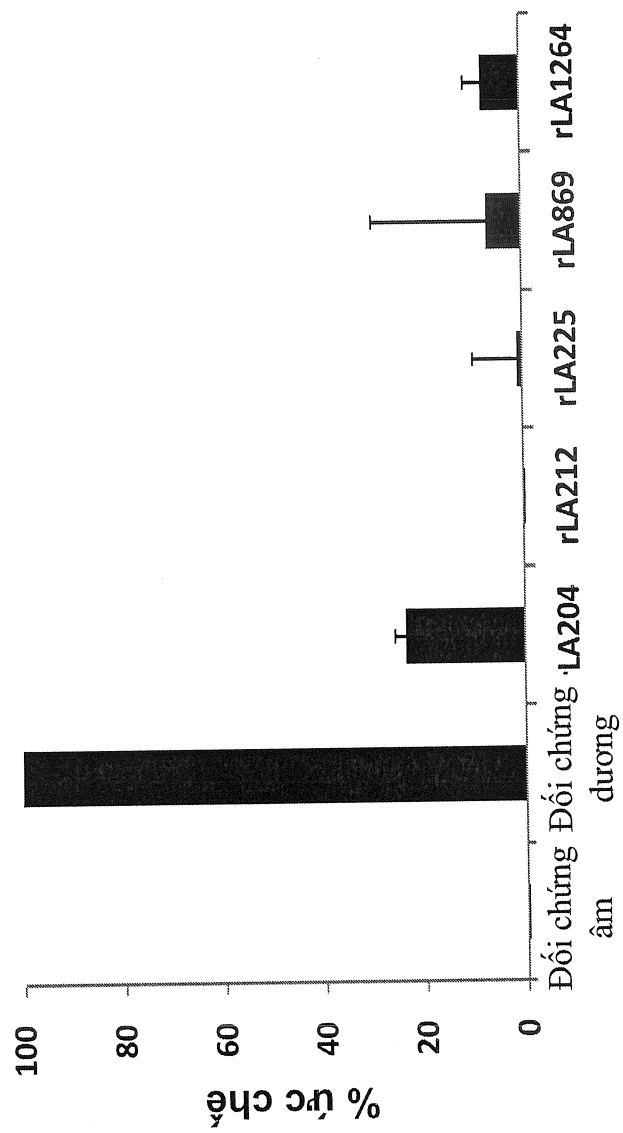
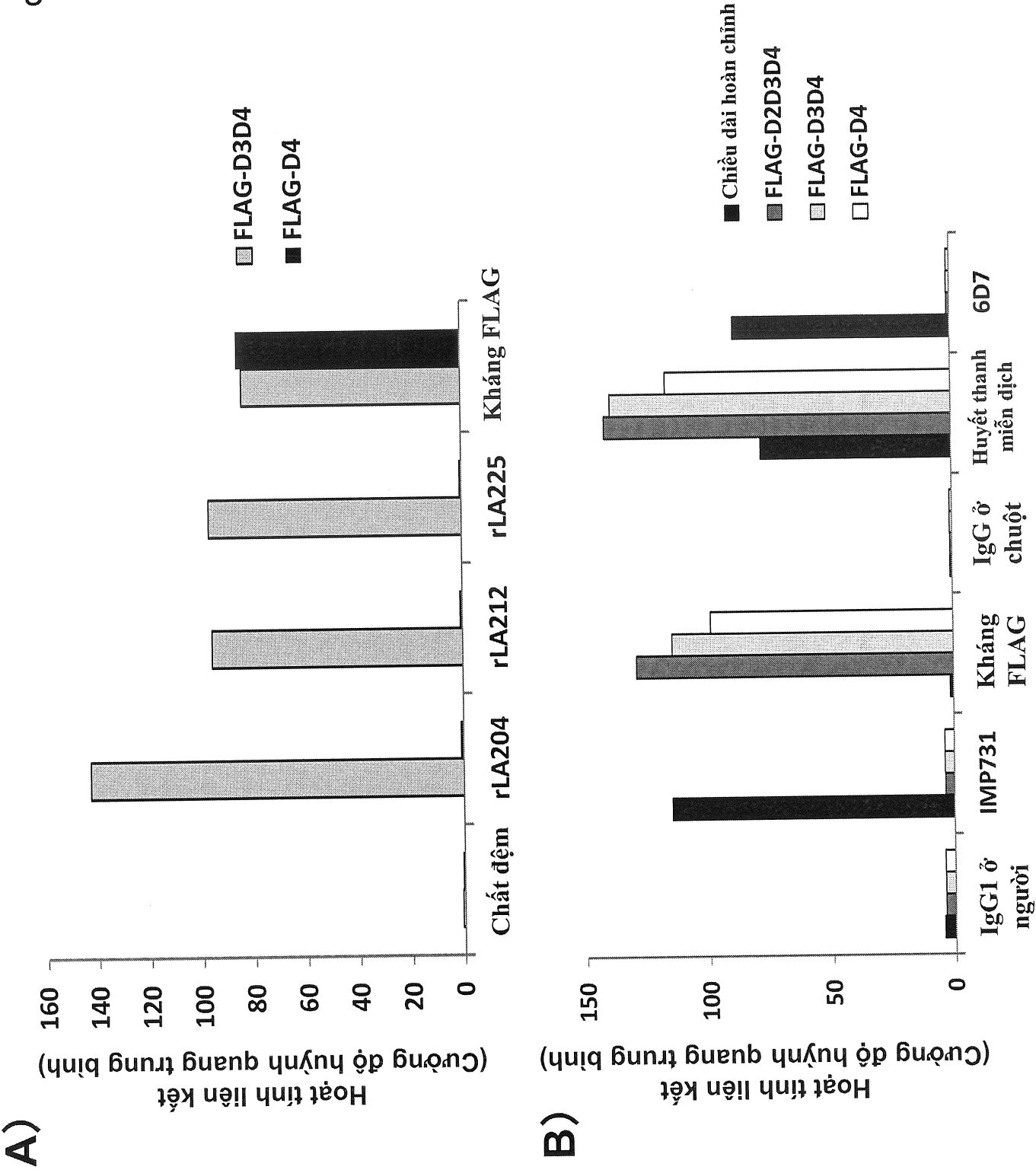
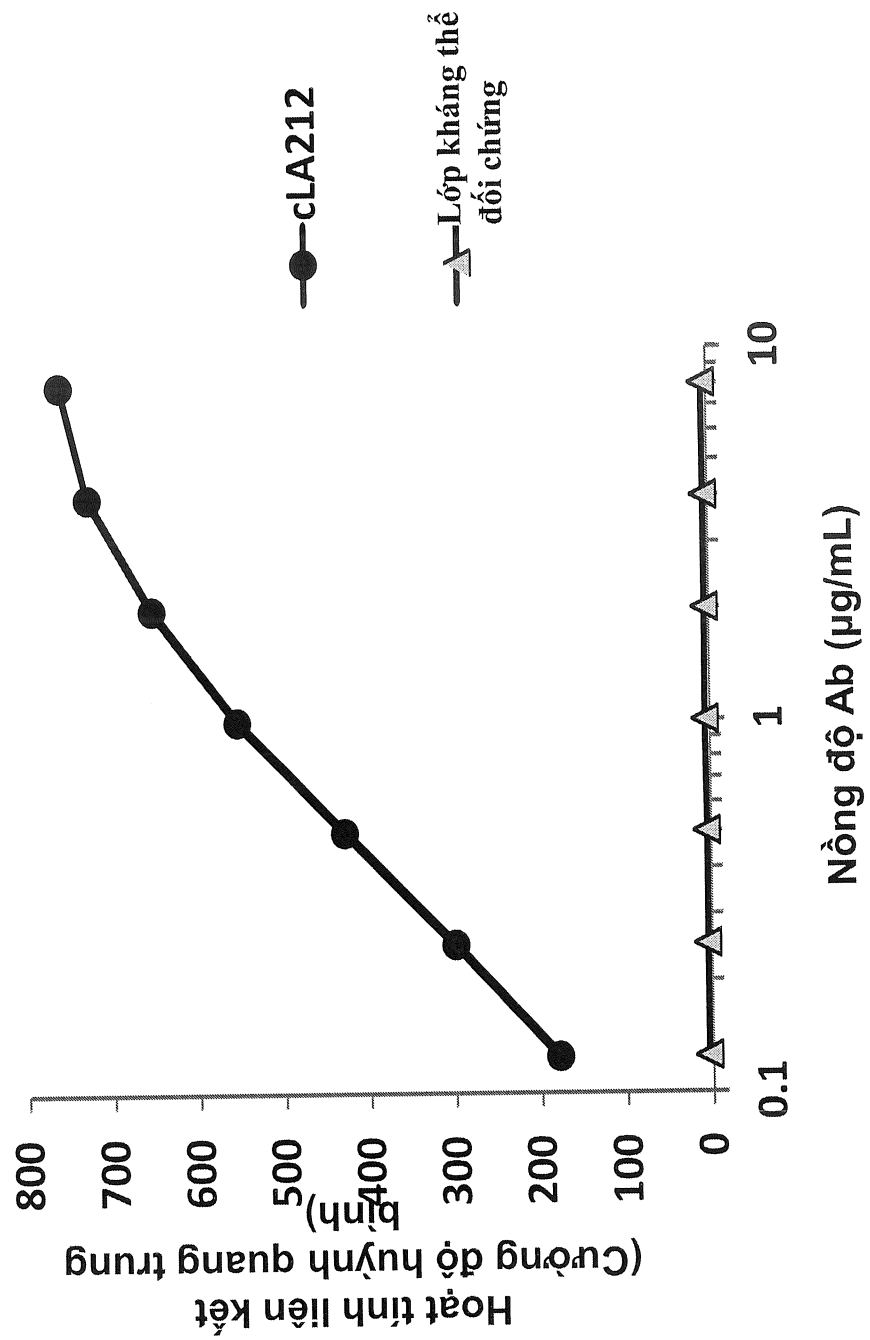


Fig. 5



6/33

Fig. 6



7/33

Fig. 7

	Kháng thể	KD (nM)
1	hLA212_H2/L1	0,11
2	hLA212_H2/L2	0,12
3	hLA212_H2/L3	0,15
4	hLA212_H2/L4	0,096
5	hLA212_H2/L5	0,12
6	hLA212_H3/L1	0,092
7	hLA212_H3/L2	0,062
8	hLA212_H3/L3	0,10
9	hLA212_H3/L4	0,076
10	hLA212_H3/L5	0,10

Fig. 8

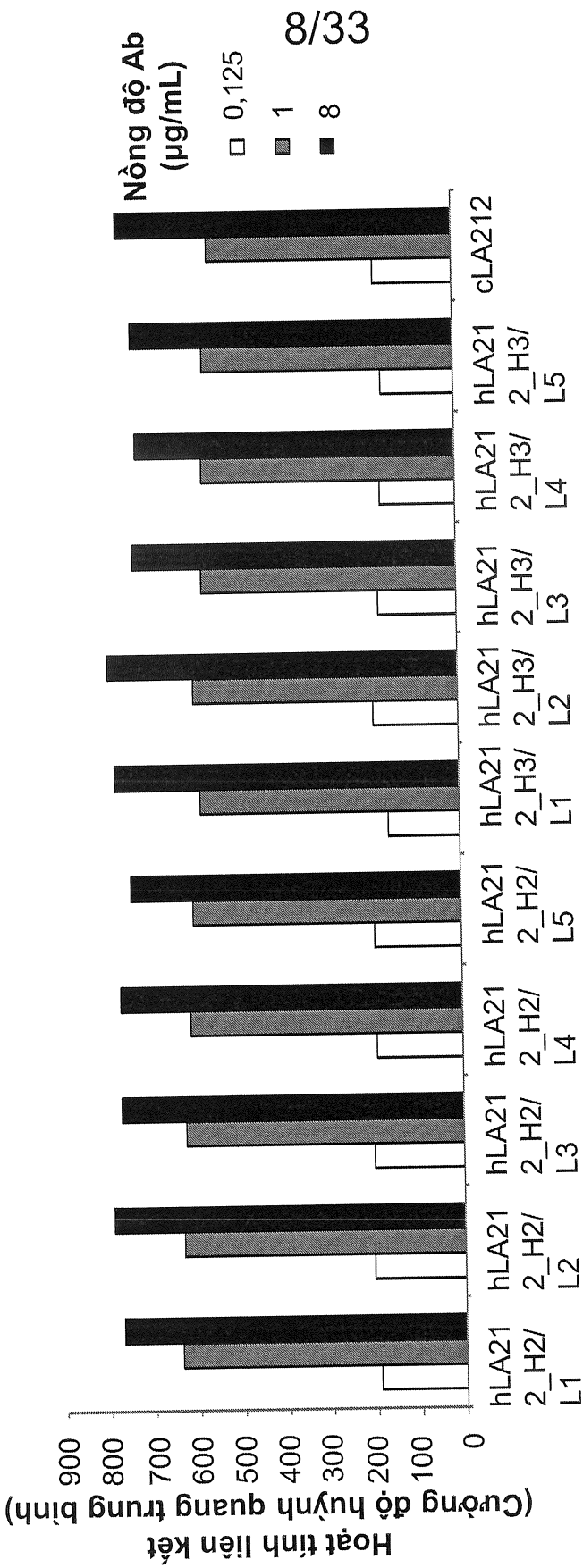
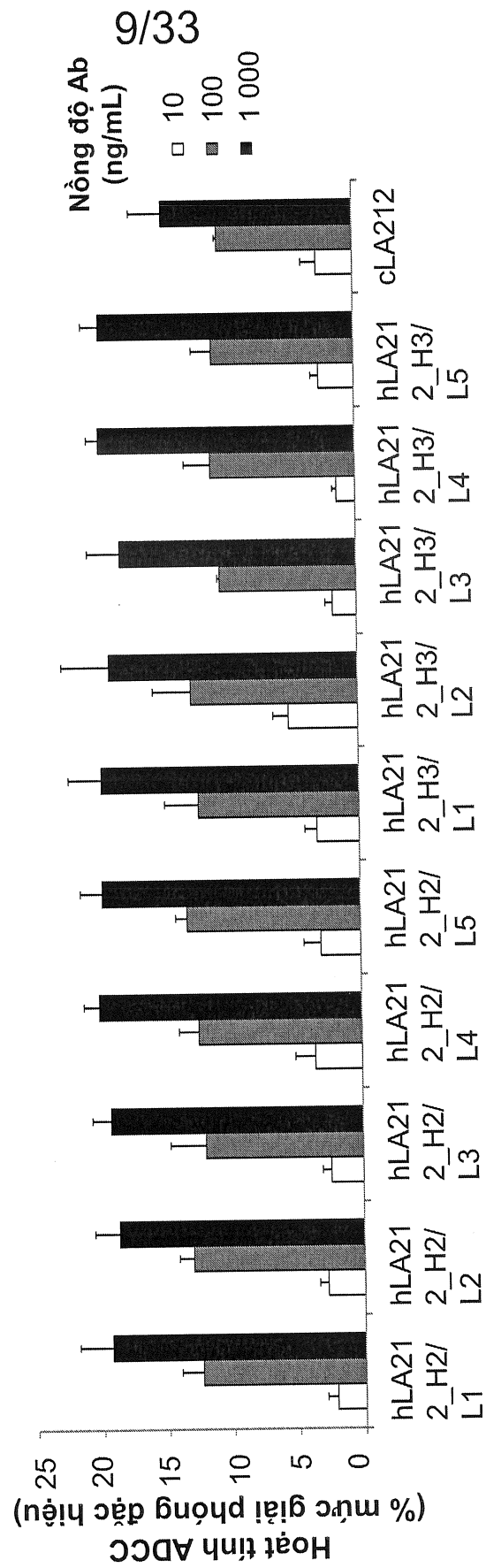
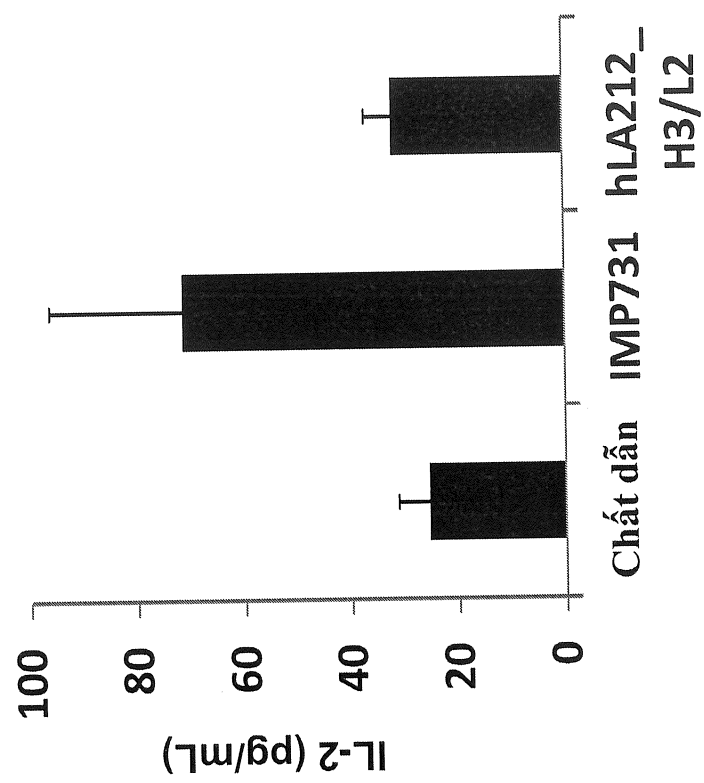


Fig. 9



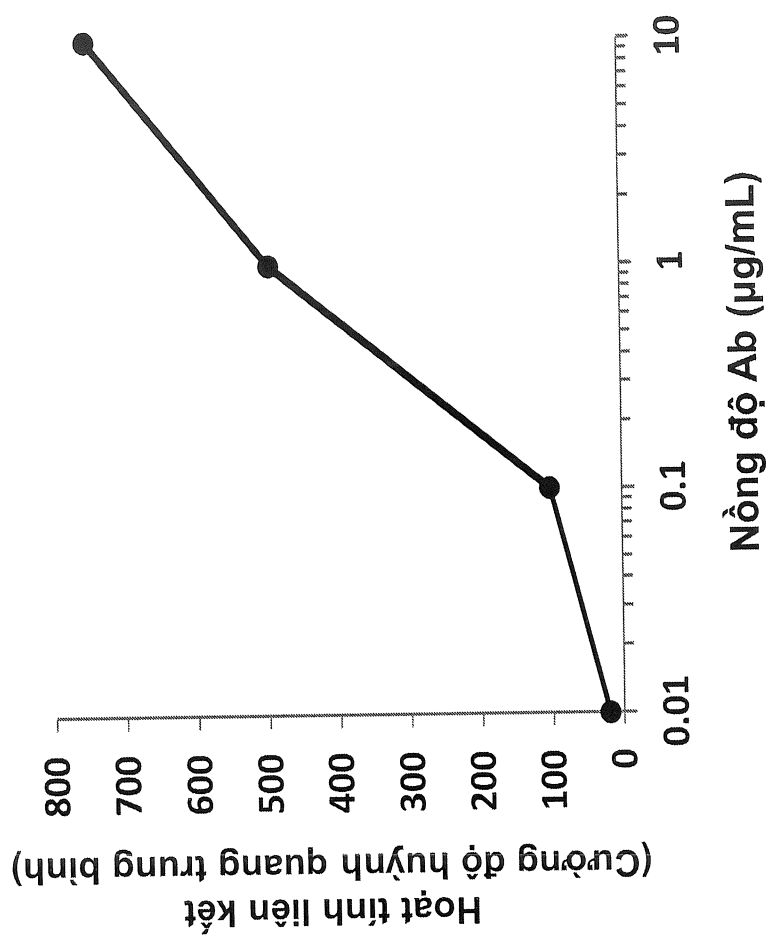
10/33

Figure 10



11/33

Fig. 11



12/33

Fig. 12

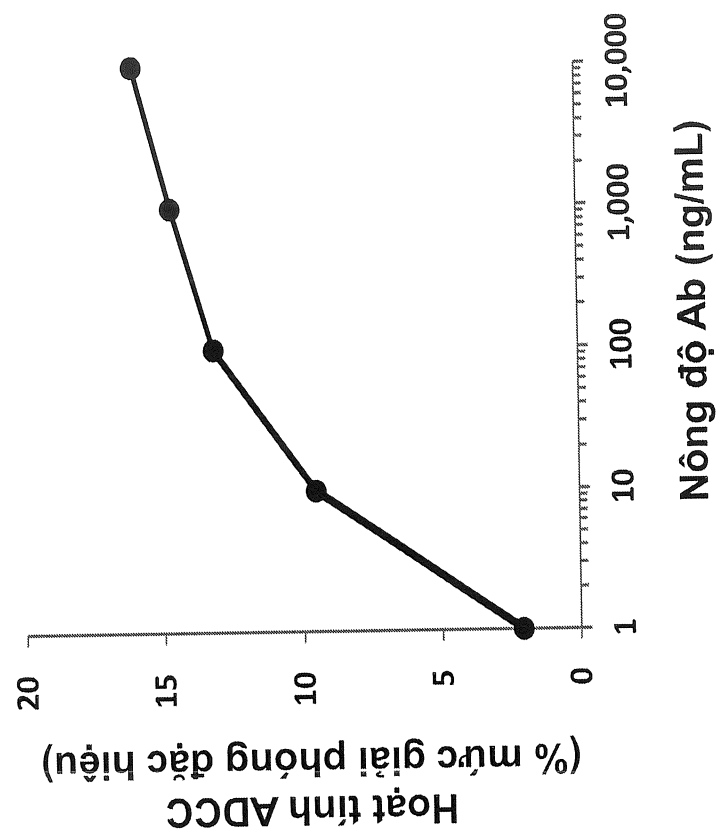
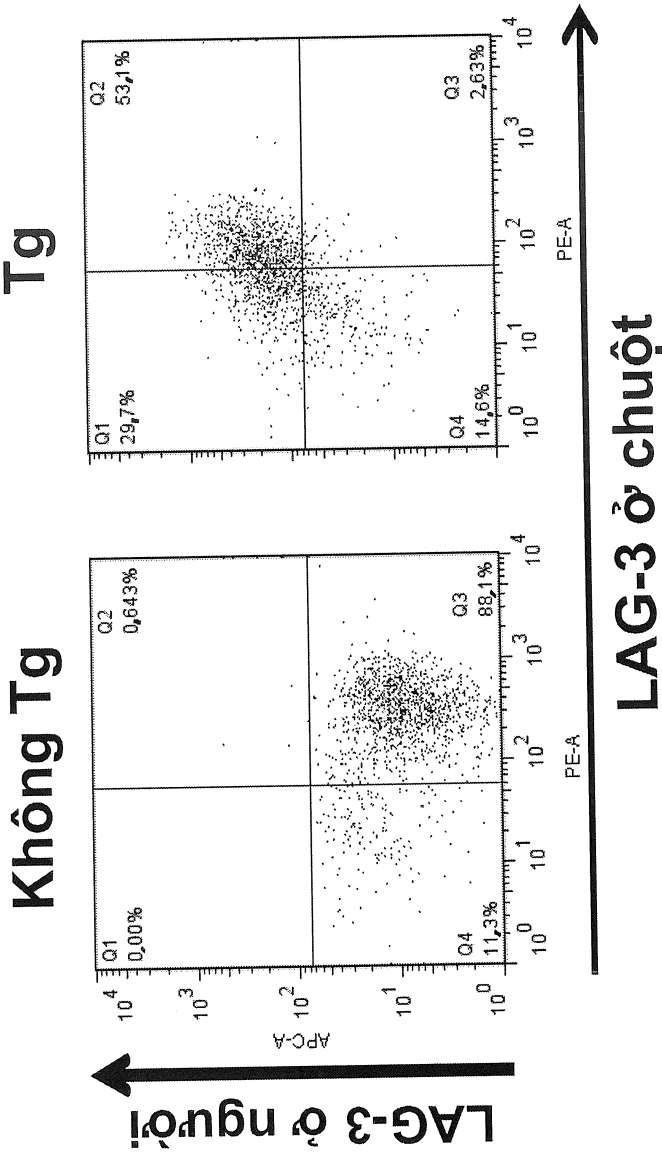
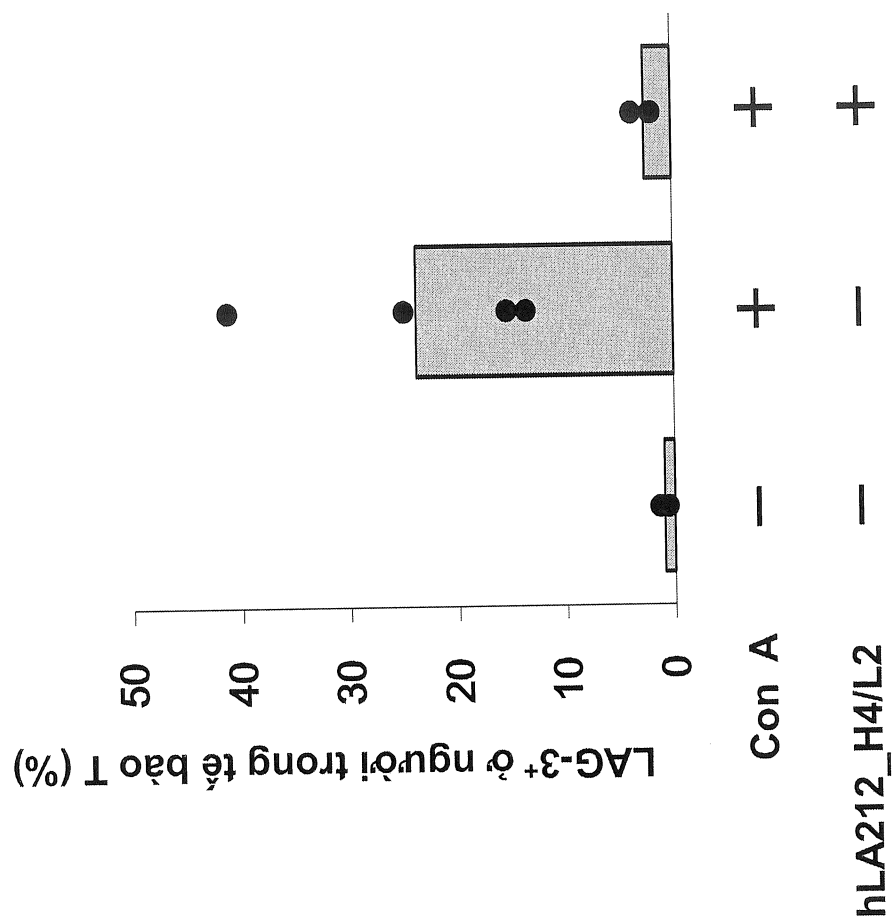


Fig. 13



14/33

Fig. 14



15/33

Fig. 15

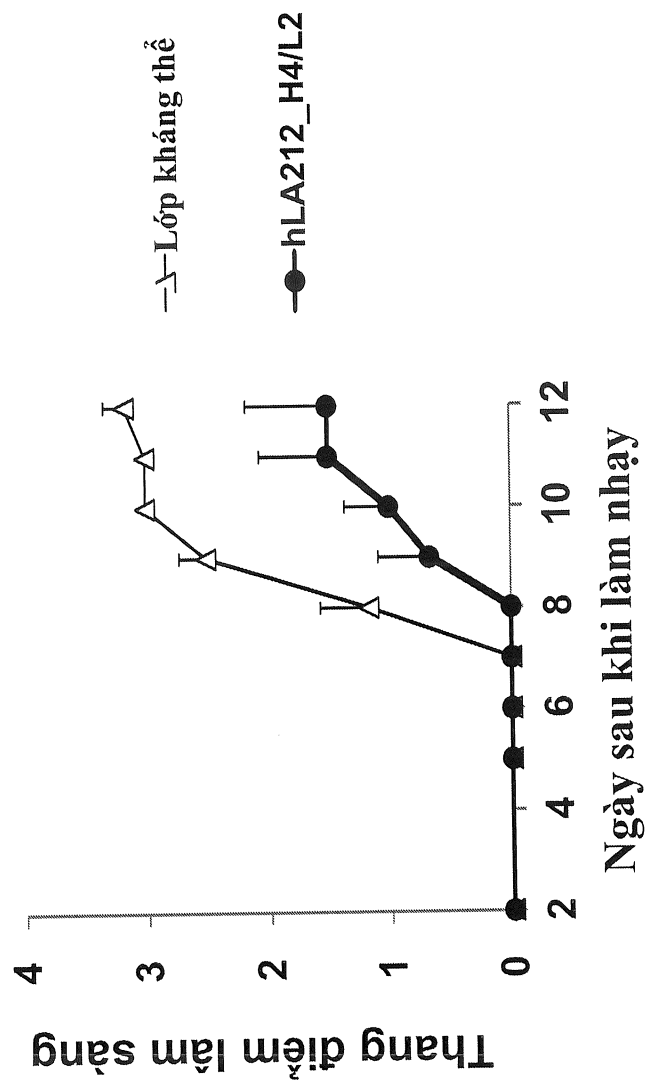


Fig. 16

GAGGTAGAGCTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCATGAAACTCTCCT
 GTGCAGCCTCAGGATTCACTTTCAGAACCTATGGCATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGAAG
 GGTCTGGAGTGGGTGCGATCCATTAGTACTGGTGGTGGTAGCACTTACTATCGCGACTCCGTGAA
 GGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATAATGCAAAAAGCACCCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGA
 GGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTACAACAGATCTAATTAACCTACCCGGGTATAGGGGGG
 TTTGCTTTCTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

vùng biến đổi(1-366)

(SEQ ID No:1)

Fig. 17

EVELVESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFRTYGMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGGSTYYRDSVKG
 RFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDATYYCTDLINYPGIGGFAPFWGQGLVTVSS

vùng biến đổi(1-122)

(SEQ ID No:2)

Fig. 18

AACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAAATCCATGTCCATATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATGAAC
 TGCAAGGCCAGTCAGAATGTGTATAATAATATAGCCTGGTATCAACAGAAGCCAGGGAAATCTCC
 TAAACTGTTGATCTACTATGCATCTAACCGGTACACTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG
 CTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCCATAGTGTGCAAGCTGAAGATGCAGCCTTTTATTACTGT
 CAGCGTCTTTACAATTCTCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATTGAAACGGGGCT

vùng biến đổi(1-327)

(SEQ ID No:3)

Fig. 19

NIVMTQSPKMSISVGDRVMTMNCKASQNVYNNIAWYQQKPGKSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGS
 GTDFTLTIHSVQAEDAAFYYCQRLYNPPTFGGGTKLELKRA

vùng biến đổi(1-109)

(SEQ ID No:4)

Fig. 20

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAAACTCTCCT
 GTGCAGCCTCAGGATTCACTTACCGTAGCTATGTCATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGAGG
 GGTCTGGAGTGGGTGCGATCCATTAGTACTGGTGGTGGTAACACTTACTATCGAGACTCCGTGAA
 GGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATAATGCAAAGAACACCCTATACCTACAAATGGACAGTCTGA
 GGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAGAAGACATGAGTAATTCGGGATACGGGCTCTTT
 GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA

vùng biến đổi(1-363)

(SEQ ID No:5)

Fig. 21

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSAASGFTYRSYVMAWVRQAPTRGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGR
 FTISRDNAKNTLYLQMDSLRESDTATYYCAEDMSNSGYGLFDYWGGQVMVTVSS
 vùng biến đổi(1-121)
 (SEQ ID No:6)

Fig. 22

AACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAAATCCATGTCCATATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATGAAC
 TGCAAGGCCGGTCAGAATGTGGATAATAATATAGCCTGGTATCAAAAGAAACCAGGGCAGTCTCC
 TAAACTGTTGATCTACTATGCATCTAACCGGAACACTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCGGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAATAGTGTGCAAGCTGAAGATGCAGCCTTTTATTACTG
 TCAGCGTATTTCCAATTCTCCGTACACGTTTGGCGCTGGGACCGAGCTGGAAGTAAACGGGCT
 vùng biến đổi(1-327)
 (SEQ ID No:7)

Fig. 23

NIVMTQSPKSMISVGDRTVMNCKAGQNVNNAWYQKKPGQSPKLLIYYASNRNTGVPDRFTGGG
 YGTDFTLTINSVQAEDAAFYYCQRISNSPYTFGAGTELELKRA
 vùng biến đổi(1-109)
 (SEQ ID No:8)

Fig. 24

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCATGAACTCTCCT
 GTGTAGCCTCAGGATTCACCTTCAGTAACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGAAGG
 GTCTGGAGTGGGTGCGATCCATTAGTACTGGTGGTGGTAACACTTACTATCGAGACTCCGTGAAG
 GGCCGATTCATCTCCAGAGATAATGCAAAAAGCACCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAG
 GTCTGAGGACACGGCACTTATTACTGTGCAAGACCCCATATGGCTATAACTACGGTTGGTTTAC
 TTAAGTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCA
 vùng biến đổi(1-363)
 (SEQ ID No:9)

Fig. 25

EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCVASGFTFSNYVMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKG
 RFTISRDNASTLYLQMDSLRESDTATYYCARPPYGYNYGWFTYWGQGLTVTVSS
 vùng biến đổi(1-121)
 (SEQ ID No:10)

Fig. 26

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAACTGTCACCATCGAA
 TGTCGAGCAAGTGAGGACATTACAATGGTTTAGTATGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAATCTCC
 TCAGCTCCTGATCTATAATGCAAATAGTATGCATACTGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGG
 ATCTGGTACACAGTATTCTCTCAAGATAAACAGCCTGCAGTCTGAAGATGTCGCAAGTTATTTCTG
 TCAACAGTATTACAATTATCCTCGGACGTTGGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATTGAAACGGGCT

vùng biến đổi(1-327)

(SEQ ID No:11)

Fig. 27

DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIHNGLVWYQQKPGKSPQLLIYNANSMHTGVPSRFSGSGSG
 TQYSLKINSLSQSEDVASYFCQQYNYNPRTFGGGTKLELKRA

vùng biến đổi(1-109)

(SEQ ID No:12)

Fig. 28

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAAACTCTCCT
 GTGCAGCCTCAGGATTCACCTATCGTACCTATGTCATGGCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAACGCAG
 GGTCTGGAGTGGGTGCGATCCATTAGTACTGGTGGTGTTAGCACTTATTATCGAGACTCCGTGAA
 GGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATAATGCAAAAAACACCCTATACTTGCAAATGGACAGTCTGA
 GGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAAAGACATGTTGAATGGTTATAACTCTCAGGGG
 CTTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA

vùng biến đổi(1-369)

(SEQ ID No:13)

Fig. 29

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTYRTRYVMAWVRQGPTQGLEWVASISTGGVSTYYRDSVKGR
 FTISRDNKNTLYLQMDSLRSEDATYYCAKDMNLNGYNSQGLFDYWQGVMVTVSS

vùng biến đổi(1-123)

(SEQ ID No:14)

Fig. 30

AACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAAATCCATGTCCATATCAGTGGGAGACAGGGTCACCATGAAC
 TGCAGGGCCAGTCAGAATGTGGATAATACTATAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCC
 TAAACTGTTGATCTACTTTGCATCTGACCGGTACACTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCGGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAATAGTGTGCAAGCTGAAGATGCAGCCTTTTATTACTG
 TCAGCGTATTTACAATTCTCCACTCACGTTCTGGGTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAGACGGGCT

vùng biến đổi(1-327)

(SEQ ID No:15)

Fig. 31

NIVMTQSPKSMISVGDRVTMNCRASQNVDNTIAWYQQKPGQSPKLLIYFASDRYTGVPDRFTGGG
 YGDTFTLTINSVQAEDAAFYYCQRIYNSPLTFGSGTKLEIRRA
 vùng biến đổi(1-109)
 (SEQ ID No:16)

Fig. 32

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAAACTCTCCT
 GTGCAGCCTCAGGATTCACCTTCAGTTCCTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGAAGG
 GTCTGGAGTGGGTGCGATACATCAGTAATGGTGGTTATAGCACTTACTATCGAGACTCCGTGAAG
 GGCCGATTCATCTCCAGAGAAAATGCAAAAAGCACCTTTACCTGCAAATGGACAGTCTGAG
 GTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTACAATCACAGATCATTGCGGGTACAGGTTTACTTACTG
 GGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCA
 vùng biến đổi(1-357)
 (SEQ ID No:17)

Fig. 33

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSAASGFTFSSYYMAWVRQAPTKGLEWVAYISNGGYSTYYRDSVKGR
 FTISRENAKSTLYLQMDSLRS EDTATYYCTITDHSGYRFTYWGQGLVTVSS
 vùng biến đổi(1-119)
 (SEQ ID No:18)

Fig. 34

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCACTCCTGTGAGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAGC
 TGCAAAGCAAGTCAGAGTATTACAACAGCTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCTGGAGAAGCTCC
 CAAACTCCTCATATATGATGCAAACAGTTTGCAAACGGGCATCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTG
 GATCTGGTACAGATTTCACTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTTCT
 GCCAGAAGTATTATAGCGGGAACACGTTTGAGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGAACGGGCT
 vùng biến đổi(1-324)
 (SEQ ID No:19)

Fig. 35

DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCASQSIYNSLAWYQQKLGEPKLLIYDANSLQTGIPSRFSGSGSGTD
 FTLTISLQPEDVATYFCQKYSGNTFGAGTKLELKRA
 vùng biến đổi(1-108)
 (SEQ ID No:20)

Fig. 36

gcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCG
GCGCGTACGGCGATATCGTGATGATTAAACGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCC
CCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCA
GAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCG
TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGC
CGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTC
ACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGTtagggggcccgttaaacgggggaggcta
(SEQ ID No:21)

Fig. 37

gcctccggactctagagccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGG
TGCTGAGCCAGGTGCAATTGTGCAGGCGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC
TACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTT
CCCCGCTGTCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG
CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
GAGTTGAGCCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGCCAGCC
CCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCA
GCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAAAtgagatatcgggcccgt
ttaaacgggggaggcta
(SEQ ID No:22)

Fig. 38

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGCA
 GCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGACGCTGGAAGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCT
 CAGGATTCACCTACCGTAGCTATGTCATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGAGGGGTCTGGAG
 TGGGTCGCATCCATTAGTACTGGTGGTGGTAACACTTACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATT
 CACTATCTCCAGAGATAATGCAAAGAACCCCTATACCTACAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGG
 ACACGGCCACTTATTACTGTGCAGAAGACATGAGTAATTCGGGATACGGGCTCTTTGATTACTGG
 GGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGC
 ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
 CGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCCGTG
 TCCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA
 CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCC
 TCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
 CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACAC
 AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACA
 ACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

trình tự tín hiệu(1-57), vùng biến đổi chuỗi nặng(58-420), vùng hằng
 định chuỗi nặng(421-1410)
 (SEQ ID No:23)

Fig. 39

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTYRSYVMAWVRQAPTRGLEW
 VASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRSEDATYTYCAEDMSNSGYGLFDYWGGQ
 VMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

trình tự tín hiệu(1-19), vùng biến đổi chuỗi nặng(20-140), vùng hằng
 định chuỗi nặng(141-470)
 (SEQ ID No:24)

Fig. 40

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCAACATT
 GTGATGACCCAGTCTCCCAAATCCATGTCCATATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATGAACTGCAA
 GGCCGGTCAGAATGTGGATAATAATATAGCCTGGTATCAAAAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAC
 TGTTGATCTACTATGCATCTAACCGGAACACTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCGGTGGATATG
 GGACAGATTTCACTCTCACCATCAATAGTGTGCAAGCTGAAGATGCAGCCTTTTATTACTGTCAGC
 GTATTTCCAATTCTCCGTACACGTTTGGCGCTGGGACCGAGCTGGAAGTAAACGGGCTGTGGCC
 GCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTG
 TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCA
 GTCCGGGAAGTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGC
 AGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCC
 ACCAGGGCCTGAGCTCCCCGTACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

trình tự tín hiệu(1-60), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(61-387), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(388-702)

(SEQ ID No:25)

Fig. 41

MVLQTQVFISLLLWISGAYGNIVMTQSPKSMISVGDRVTMNCKAGQNVNNAWYQKKPGQSPKL
 LIYYASNRNTGVPDRFTGGGYGTDFTLTINSVQAEDAAFYYCQRISNSPYTFGAGTELELKRAVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

trình tự tín hiệu(1-20), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(21-129), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(130-234)

(SEQ ID No:26)

Fig. 42

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTGCA
 GCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCC
 AGCGGCTTACCTACCGGTCTTACGTGATGGCCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGAAAAGGACTGGA
 ATGGGTGGGATCCATCAGCACCGGCGGAGGCAACACCTACTACCGGGATAGCGTGAAGGGCCGG
 TTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA
 GGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCGAGGATATGAGCAACAGCGGCTACGGCCTGTTGACTACT
 GGGGCCAGGGAACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG
 GCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT
 CCCCCAACCCTGACCGTGAGCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCG
 CTGTCCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
 GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
 GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
 ACCCTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGT
 GGTGAGCGTCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAA
 CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAG
 AACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
 GCACAACCACTACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

trình tự tín hiệu(1-57), vùng biến đổi chuỗi nặng(58-420), vùng hằng
 định chuỗi nặng(421-1410)
 (SEQ ID No:27)

Fig. 43

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTYRSYVMAWVRQAPGKGLE
 WVGSISSGGNTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAEDMSNSGYGLFDYWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

trình tự tín hiệu(1-19), vùng biến đổi chuỗi nặng(20-140), vùng hằng
 định chuỗi nặng(141-470)
 (SEQ ID No:28)

Fig. 44

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTGCA
 GCTGGTGGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCC
 AGCGGCTTACCTACCGGTCTTACGTGATGGCCTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGAAAAGGACTGGA
 ATGGGTGGCCAGCATCAGCACCGGCGGAGGCAACACCTACTACCGGGATAGCGTGAAGGGCCG
 GTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGGACAGCCTGCGGGCCG
 AGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCGAGGACATGAGCAACAGCGGCTACGGCCTGTTCGACTAC
 TGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCT
 GGCACCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
 TCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCC
 GCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG
 TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
 GACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGG
 GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
 TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGG
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC
 CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCCG
 AGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC
 TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

trình tự tín hiệu(1-57), vùng biến đổi chuỗi nặng(58-420), vùng hằng
 định chuỗi nặng(421-1410)
 (SEQ ID No:29)

Fig. 45

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTYRSYVMAWVRQAPGKGL
 WVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCAEDMSNSGYGLFDYWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

trình tự tín hiệu(1-19), vùng biến đổi chuỗi nặng(20-140), vùng hằng
 định chuỗi nặng(141-470)
 (SEQ ID No:30)

Fig. 46

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATC
 CAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTA
 AAGCCGGCCAGAACGTGGACAACAATATCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAA
 GCTGCTGATCTACTACGCCAGCAACCGGAACACCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCT
 CCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCC
 AGAGAATCAGCAACAGCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGT
 GGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGT
 GGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC
 CTGCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
 TGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGT
 GACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

trình tự tín hiệu(1-60), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(61-387), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(388-702)

(SEQ ID No:31)

Fig. 47

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKAGQNVNINIAWYQQKPGQAPKLLI
 YYASNRNTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRISNSPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

trình tự tín hiệu(1-20), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(21-129), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(130-234)

(SEQ ID No:32)

Fig. 48

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATC
 CAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTA
 AAGCCGGCCAGAACGTGGACAACAATATCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAA
 GCTGCTGATCTACTACGCCAGCAACCGGAACACCGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCT
 ACGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCC
 AGAGAATCAGCAACAGCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGT
 GGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGT
 GGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC
 CTGCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
 TGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGT
 GACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

trình tự tín hiệu(1-60), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(61-387), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(388-702)

(SEQ ID No:33)

Fig. 49

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAGQNVDNNIAWYQQKPGQSPKLLI
 YYASNRNTGVPSRFSGSGYGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRISNSPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

trình tự tín hiệu(1-20), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(21-129), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(130-234)

(SEQ ID No:34)

Fig. 50

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCAACATC
 CAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAA
 GGCCGGCCAGAACGTGGACAACAATATCGCCTGGTATCAGAAGAAGCCCGGCCAGTCCCCAAG
 CTGCTGATCTACTACGCCAGCAACCGGAACACCGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCGGAGGCTA
 CGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCTTCTACTACTGTCA
 GCGGATCAGCAACAGCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTG
 GCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG
 GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCT
 GCAGTCCGGGAAGTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTG
 AGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGA
 CCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

trình tự tín hiệu(1-60), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(61-387), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(388-702)

(SEQ ID No:35)

Fig. 51

MVLQTQVFISLLLWISGAYGNIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAGQNVDNNIAWYQKKPGQSPKLLI
 YYASNRNTGVDPDRFSGGGYGTDFTLTISLQPEDFAFYCQRISNSPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

trình tự tín hiệu(1-20), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(21-129), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(130-234)

(SEQ ID No:36)

Fig. 52

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATC
 CAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCATGAGCATCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATGACCTGCA
 AGGCCGGCCAGAACGTGGACAACAATATCGCCTGGTATCAGAAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAA
 GCTGCTGATCTACTACGCCAGCAACCGGAACACCGGCGTGCCGAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCT
 CCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGACGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCC
 AGAGAATCAGCAACAGCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGTACGGT
 GGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGT
 GGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC
 CTGCAGTCCGGGAAGTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
 TGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGT
 GACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

trình tự tín hiệu(1-60), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(61-387), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(388-702)

(SEQ ID No:37)

Fig. 53

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSMSISVGDRVTMTCKAGQNVNINIAWYQKKPGQSPKL
 LIYYASNRNTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQRISNSPYTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

trình tự tín hiệu(1-20), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(21-129), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(130-234)

(SEQ ID No:38)

Fig. 54

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCAACATC
 CAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCATGAGCATCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATGACCTGCA
 AGGCCGGCCAGAACGTGGACAACAATATCGCCTGGTATCAGAAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAA
 GCTGCTGATCTACTACGCCAGCAACCGGAACACCGGCGTGCCGACAGATTTTCCGGCGGAGGCT
 ACGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGACGCCCCGAGGACGCCGCTTCTACTACTGTC
 AGCGGATCAGCAACAGCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGTACGGT
 GGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGT
 GGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC
 CTGCAGTCCGGGAAGTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
 TGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGT
 GACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

trình tự tín hiệu(1-60), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(61-387), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(388-702)

(SEQ ID No:39)

Fig. 55

MVLQTQVFISLLWISGAYGNIQMTQSPSSMSISVGDRVTMTCKAGQNVDNNAWYQKKPGQSPKL
 LIYYASNRNTGVPDRFSGGGYGTDFTLTISVQPEDAAFYYCQRISNSPYTFGQGTKLELKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

trình tự tín hiệu(1-20), vùng biến đổi chuỗi nhẹ(21-129), vùng hằng định
 chuỗi nhẹ(130-234)

(SEQ ID No:40)

Fig. 56

GFTFRTYGMA

(SEQ ID No:41)

Fig. 57

SISTGGGSTYYRDSVKG

(SEQ ID No:42)

Fig. 58

DLINYPGIGGFAF

(SEQ ID No:43)

Fig. 59

KASQNVYNNIA

(SEQ ID No:44)

Fig. 60

YASNRYT

(SEQ ID No:45)

Fig. 61

QRLYNPPT

(SEQ ID No:46)

Fig. 62

GFTYRSYVMA

(SEQ ID No:47)

Fig. 63
SISTGGGNTYYRDSVKG
(SEQ ID No:48)

Fig. 64
DMSNSGYGLFDY
(SEQ ID No:49)

Fig. 65
KAGQNVDDNIA
(SEQ ID No:50)

Fig. 66
YASNRNT
(SEQ ID No:51)

Fig. 67
QRISNSPYT
(SEQ ID No:52)

Fig. 68
GFTFSNYYMA
(SEQ ID No:53)

Fig. 69
SISTGGGNTYYRDSVKG
(SEQ ID No:54)

Fig. 70
PPYGYNYGWFTY
(SEQ ID No:55)

Fig. 71
RASEDIHNGLV
(SEQ ID No:56)

Fig. 72
NANSMHT
(SEQ ID No:57)

Fig. 73
QQYYNYPRT
(SEQ ID No:58)

Fig. 74
GFTYRTYVMA
(SEQ ID No:59)

Fig. 75
SISTGGVSTYYRDSVKG
(SEQ ID No:60)

Fig. 76
DMLNGYNSQGLFDY
(SEQ ID No:61)

Fig. 77
RASQNVNTIA
(SEQ ID No:62)

Fig. 78
FASDRYT
(SEQ ID No:63)

Fig. 79
QRIYNSPLT
(SEQ ID No:64)

Fig. 80
GFTFSSYYMA
(SEQ ID No:65)

Fig. 81
YISNGGYSTYYRDSVKG
(SEQ ID No:66)

Fig. 82
TDHSGYRFTY
(SEQ ID No:67)

Fig. 83
KASQSIYNLSA
(SEQ ID No:68)

Fig. 84
DANSLQT
(SEQ ID No:69)

Fig. 85
QKYYSNT
(SEQ ID No:70)

Fig. 86
CTCCAGAGTTCCAGGTCACGGTGACTGGC
(SEQ ID No:71)

Fig. 87
TCAGTAACACTGTCCAGGACACCATCTC
(SEQ ID No:72)

Fig. 88
TATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGC
(SEQ ID No:73)

Fig. 89
GCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTG
(SEQ ID No:74)

Fig. 90
CCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG
(SEQ ID No:75)

Fig. 91
CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACTGTGACCATGACTCCTTGGCCCCAG
(SEQ ID No:76)

Fig. 92

ATCTCCGGCGCGTACGGCAACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAAATCC
(SEQ ID No:77)

Fig. 93

GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAGTTCCAGCTCGGTCCCAGC
(SEQ ID No:78)

Fig. 94

ATGTGGGAGGCTCAGTTCCTGGGCTTGCTGTTTC
(SEQ ID No:79)

Fig. 95

GCCCGAGCCCGAGCCCGAGCCGGAGCAGCTCTGA
(SEQ ID No:80)

Fig. 96

GAGTATGTGTTGACTGGTTGATAACTATCG
(SEQ ID No:81)

Fig. 97

GCCATGACAGATTAGCCATGTCTGCAGCAC
(SEQ ID No:82)

Fig. 98

CAGGACCTTTTTCTAACCTCCCTTGGAGGGCTGGGGAGGCCCGGGCCATAGAGGAG
(SEQ ID No:83)

Fig. 99

CCTGGAGCCGAGGCAGCCAGCAGGTCTCAGCAGCTCCGCCCCGCCGCCGCCGCCGCC
(SEQ ID No:84)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
 <120> Kháng thể để điều trị bệnh tự miễn và dược phẩm chứa nó
 <130> FP1712
 <150> JP2016-175491
 <151> 2016-09-08
 <160> 86
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(366)
 <400> 1
 gag gta gag ctg gtg gag tct ggg ggc ggc tta gtg cag cct gga agg
 48
 Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc atg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc act ttc aga acc tat
 96
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr
 20 25 30
 ggc atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca acg aag ggt ctg gag tgg gtc
 144
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca tcc att agt act ggt ggt ggt agc act tac tat cgc gac tcc gtg
 192
 Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aaa agc acc cta tac
 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act tat tac tgt
288

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

aca aca gat cta att aac tac ccg ggt ata ggg ggg ttt gct ttc tgg
336

Thr Thr Asp Leu Ile Asn Tyr Pro Gly Ile Gly Gly Phe Ala Phe Trp
100 105 110

ggc caa ggc act ctg gtc act gtc tct tca
366

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

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Asp Leu Ile Asn Tyr Pro Gly Ile Gly Gly Phe Ala Phe Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 3
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400> 3
 aac att gtg atg acc cag tct ccc aaa tcc atg tcc ata tca gta gga
 48
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac agg gtc acc atg aac tgc aag gcc agt cag aat gtg tat aat aat
 96
 Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Tyr Asn Asn
 20 25 30
 ata gcc tgg tat caa cag aag cca ggg aaa tct cct aaa ctg ttg atc
 144
 Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tac tat gca tct aac cgg tac act ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc
 192
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 agt ggc tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc cat agt gtg caa gct
 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 gaa gat gca gcc ttt tat tac tgt cag cgt ctt tac aat tct cct ccg
 288
 Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Leu Tyr Asn Ser Pro Pro
 85 90 95
 acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa ttg aaa cgg gct
 327
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 100 105

<210> 4
 <211> 109

<212> PRT

<213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 4

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Leu Tyr Asn Ser Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 5

<211> 363

<212> DNA

<213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 5

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga agg
 48

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

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc act tac cgt agc tat
 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg Ser Tyr

20 25 30
 gtc atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca acg agg ggt ctg gag tgg gtc
 144
 Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca tcc att agt act ggt ggt ggt aac act tac tat cga gac tcc gtg
 192
 Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aag aac acc cta tac
 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 cta caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act tat tac tgt
 288
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca gaa gac atg agt aat tcg gga tac ggg ctc ttt gat tac tgg ggc
 336
 Ala Glu Asp Met Ser Asn Ser Gly Tyr Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 caa gga gtc atg gtc aca gtc tcc tca
 363
 Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 6
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)
 <400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

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

Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400> 7
 aac att gtg atg acc cag tct ccc aaa tcc atg tcc ata tca gta gga
 48
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac agg gtc acc atg aac tgc aag gcc ggt cag aat gtg gat aat aat
 96
 Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Gly Gln Asn Val Asp Asn Asn
 20 25 30

ata gcc tgg tat caa aag aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ttg atc
 144
 Ile Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tac tat gca tct aac cgg aac act ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc
 192
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

ggt gga tat ggg aca gat ttc act ctc acc atc aat agt gtg caa gct
240

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

gaa gat gca gcc ttt tat tac tgt cag cgt att tcc aat tct ccg tac
288

Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser Asn Ser Pro Tyr
85 90 95

acg ttt ggc gct ggg acc gag ctg gaa ctg aaa cgg gct
327

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

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 8

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser Asn Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 9

<211> 363
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<400> 9
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga agg
 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc atg aaa ctc tcc tgt gta gcc tca gga ttc act ttc agt aac tat
 96
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 tac atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca acg aag ggt ctg gag tgg gtc
 144
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca tcc att agt act ggt ggt ggt aac act tac tat cga gac tcc gtg
 192
 Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aaa agc acc cta tac
 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act tat tac tgt
 288
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aga ccc cca tat ggc tat aac tac ggt tgg ttt act tac tgg ggc
 336
 Ala Arg Pro Pro Tyr Gly Tyr Asn Tyr Gly Trp Phe Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110
 caa ggc act ctg gtc act gtc tct tca
 363
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Pro Pro Tyr Gly Tyr Asn Tyr Gly Trp Phe Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400> 11
 gac atc cag atg aca cag tct cca gct tcc ctg tct gca tct ctg gga
 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

```

1                5                10                15
gaa act gtc acc atc gaa tgt cga gca agt gag gac att cac aat ggt
96
Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile His Asn Gly
20                25                30

tta gta tgg tat cag cag aag cca ggg aaa tct cct cag ctc ctg atc
144
Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35                40                45

tat aat gca aat agt atg cat act ggg gtc cca tca cgg ttc agt ggc
192
Tyr Asn Ala Asn Ser Met His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50                55                60

agt gga tct ggt aca cag tat tct ctc aag ata aac agc ctg cag tct
240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65                70                75                80

gaa gat gtc gca agt tat ttc tgt caa cag tat tac aat tat cct cgg
288
Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg
85                90                95

acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa ttg aaa cgg gct
327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
100                105

<210> 12
<211> 109
<212> PRT
<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 12

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile His Asn Gly
20                25                30

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

```

Tyr Asn Ala Asn Ser Met His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 13
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)

<400> 13
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga agg
 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc act tat cgt acc tat
 96
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg Thr Tyr
 20 25 30

gtc atg gcc tgg gtc cgc cag ggt cca acg cag ggt ctg gag tgg gtc
 144
 Val Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Thr Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca tcc att agt act ggt ggt gtt agc act tat tat cga gac tcc gtg
 192
 Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aaa aac acc cta tac
 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ttg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act tat tac tgt
288

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

gca aaa gac atg ttg aat ggt tat aac tct cag ggg ctt ttt gat tac
336

Ala Lys Asp Met Leu Asn Gly Tyr Asn Ser Gln Gly Leu Phe Asp Tyr
100 105 110

tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc tcc tca
369

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 123

<212> PRT

<213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Met Leu Asn Gly Tyr Asn Ser Gln Gly Leu Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 15
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400> 15
 aac att gtg atg acc cag tct ccc aaa tcc atg tcc ata tca gtg gga
 48
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac agg gtc acc atg aac tgc agg gcc agt cag aat gtg gat aat act
 96
 Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asp Asn Thr
 20 25 30
 ata gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ttg atc
 144
 Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tac ttt gca tct gac cgg tac act ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc
 192
 Tyr Phe Ala Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 ggt gga tat ggg aca gat ttc act ctc acc atc aat agt gtg caa gct
 240
 Gly Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 gaa gat gca gcc ttt tat tac tgt cag cgt att tac aat tct cca ctc
 288
 Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Tyr Asn Ser Pro Leu
 85 90 95
 acg ttc ggt tct ggg acc aag ctg gag atc aga cgg gct
 327
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg Arg Ala
 100 105

<210> 16
 <211> 109

<212> PRT

<213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 16

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Tyr Asn Ser Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 17

<211> 357

<212> DNA

<213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 17

gag gtg cag ctg gtg gaa tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga agg
 48

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

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc act ttc agt tcc tat
 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

```

                20                      25                      30
tac atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca acg aag ggt ctg gag tgg gtc
144
Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                      40                      45

gca tac atc agt aat ggt ggt tat agc act tac tat cga gac tcc gtg
192
Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Tyr Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
      50                      55                      60

aag ggc cga ttc act atc tcc aga gaa aat gca aaa agc acc ctt tac
240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
      65                      70                      75                      80

ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act tat tac tgt
288
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

aca atc aca gat cat tcg ggg tac agg ttt act tac tgg ggc caa ggc
336
Thr Ile Thr Asp His Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
      100                      105                      110

act ctg gtc act gtc tct tca
357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

<210> 18
<211> 119
<212> PRT
<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 18

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

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

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

```

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

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

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

Thr Ile Thr Asp His Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 19
 gac atc cag atg acc cag tct cct tca ctc ctg tca gca tct gtg gga
 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac aga gtc act ctc agc tgc aaa gca agt cag agt att tac aac agc
 96
 Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Ser
 20 25 30

tta gcc tgg tat cag caa aaa ctt gga gaa gct ccc aaa ctc ctc ata
 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca aac agt ttg caa acg ggc atc cca tca agg ttc agt ggc
 192
 Tyr Asp Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggt aca gat ttc aca ctc acc atc agc agc ctg cag cct
240

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

gaa gat gtt gcc aca tat ttc tgc cag aag tat tat agc ggg aac acg
288

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Lys Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
85 90 95

ttt gga gct ggg acc aag ctg gaa ctg aaa cgg gct
324

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

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 20

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Lys Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
85 90 95

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

<210> 21

<211> 449
 <212> DNA
 <213> Loài người (Homo sapiens)

<400> 21
 gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagaccag gtgttcatct cctgctgct
 60
 gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacgggtg cgcgccctc
 120
 cgtgttcata tccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtggtgtg
 180
 cctgctgaat aacttctacc ccagagaggc caaggtgcag tggaaggtgg acaacgccct
 240
 gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacag
 300
 cctgagcagc accctgacct tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg
 360
 cgaggtgacc caccagggcc tgagctcccc cgtcaccaag agcttcaaca ggggggagtg
 420
 ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta
 449

<210> 22
 <211> 1132
 <212> DNA
 <213> Loài người (Homo sapiens)

<400> 22
 gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttcctcctgc tgggtggcagc
 60
 tccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagc ctccaccaag
 120
 ggcccaagcg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc
 180
 ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccctga ccgtgagctg gaactcaggc
 240
 gccctgacca ggggcgtgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc
 300

ctcagcagcg tggtagaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac
360

gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtagac
420

aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tgggggggacc ctcagtcttc
480

ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc
540

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc
600

gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccc cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg
660

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc
720

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc
780

cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac
840

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg
900

gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccacc ctcccgctgct ggactccgac
960

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac
1020

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacca gaagagcctc
1080

tcctgtctc ccggcaaagt agatatcggg cccgtttaa cgggggaggc ta
1132

<210> 23
<211> 1410
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> dạng khảm

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1410)

<400> 23

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg
48

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtg ctg agc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag
96

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

cct gga agg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tca gga ttc act tac
144

Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr
35 40 45

cgt agc tat gtc atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca acg agg ggt ctg
192

Arg Ser Tyr Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Arg Gly Leu
50 55 60

gag tgg gtc gca tcc att agt act ggt ggt ggt aac act tac tat cga
240

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

gac tcc gtg aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aag aac
288

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

acc cta tac cta caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act
336

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

tat tac tgt gca gaa gac atg agt aat tcg gga tac ggg ctc ttt gat
384

Tyr Tyr Cys Ala Glu Asp Met Ser Asn Ser Gly Tyr Gly Leu Phe Asp
115 120 125

tac tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc agc tca gcc tcc acc aag
432

Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc
480

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc
 528
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc
 576
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg
 624
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac
 672
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc
 720
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240
 aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa
 768
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac
 816
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac
 864
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc
 912
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac
 960
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg
 1008
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca
 1056
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa
 1104
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac
 1152
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc
 1200
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc
 1248
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag
 1296
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc
 1344
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc
 1392
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa
 1410
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 24
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr
 35 40 45

Arg Ser Tyr Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Arg Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Glu Asp Met Ser Asn Ser Gly Tyr Gly Leu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 25
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dạng khảm

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 25
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc
 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

ggc gcg tac ggc aac att gtg atg acc cag tct ccc aaa tcc atg tcc
 96
 Gly Ala Tyr Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
 20 25 30

ata tca gta gga gac agg gtc acc atg aac tgc aag gcc ggt cag aat
 144

```

Ile Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Gly Gln Asn
    35                                40                                45

gtg gat aat aat ata gcc tgg tat caa aag aaa cca ggg cag tct cct
192
Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro
    50                                55                                60

aaa ctg ttg atc tac tat gca tct aac cgg aac act ggg gtc cct gat
240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp
    65                                70                                75                                80

cgc ttc aca ggc ggt gga tat ggg aca gat ttc act ctc acc atc aat
288
Arg Phe Thr Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
    85                                90                                95

agt gtg caa gct gaa gat gca gcc ttt tat tac tgt cag cgt att tcc
336
Ser Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
    100                                105                                110

aat tct ccg tac acg ttt ggc gct ggg acc gag ctg gaa ctg aaa cgg
384
Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Glu Leu Lys Arg
    115                                120                                125

gct gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag cag
432
Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                                135                                140

ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tac
480
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    145                                150                                155                                160

ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag tcc
528
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
    165                                170                                175

ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac agc acc
576
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
    180                                185                                190

tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac tac gag aag
624
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
    195                                200                                205

```

cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc tcc ccc
672

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt
702

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 26

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
20 25 30

Ile Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Gly Gln Asn
35 40 45

Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
100 105 110

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Glu Leu Lys Arg
115 120 125

Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 27
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> được nhân hóa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1410)

<400> 27
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg
 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtg ctg agc gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag
 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20	25	30
cct ggc gga tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc ttc acc tac		
144		
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr		
35	40	45
cgg tct tac gtg atg gcc tgg gtg cgc cag gcc cct gga aaa gga ctg		
192		
Arg Ser Tyr Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60
gaa tgg gtg gga tcc atc agc acc ggc gga ggc aac acc tac tac cgg		
240		
Glu Trp Val Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg		
65	70	75
gat agc gtg aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac gcc aag aac		
288		
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn		
85	90	95
acc ctg tac ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg		
336		
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
tac tat tgc gcc gag gat atg agc aac agc ggc tac ggc ctg ttc gac		
384		
Tyr Tyr Cys Ala Glu Asp Met Ser Asn Ser Gly Tyr Gly Leu Phe Asp		
115	120	125
tac tgg ggc cag gga acc ctc gtg acc gtc agc tca gcc tcc acc aag		
432		
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
130	135	140
ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc		
480		
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
145	150	155
ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc		
528		
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
165	170	175
gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc		
576		
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
180	185	190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg
 624
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac
 672
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc
 720
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa
 768
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac
 816
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac
 864
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc
 912
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac
 960
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg
 1008
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca
 1056
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa
 1104

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac
 1152

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc
 1200

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc
 1248

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag
 1296

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc
 1344

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc
 1392

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa
 1410

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 28
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 28

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr
 35 40 45

Arg Ser Tyr Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Glu Asp Met Ser Asn Ser Gly Tyr Gly Leu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 29
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> được nhân hóa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1410)

<400> 29
 atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg
 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 gtg ctg agc gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag
 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 cct ggc gga tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc ttc acc tac
 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr
 35 40 45
 cgg tct tac gtg atg gcc tgg gtg cgc cag gcc cct gga aaa gga ctg
 192
 Arg Ser Tyr Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 gaa tgg gtg gcc agc atc agc acc ggc gga ggc aac acc tac tac cgg
 240
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg
 65 70 75 80

gat agc gtg aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac gcc aag aac
288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

acc ctg tac ctg cag atg gac agc ctg cgg gcc gag gat acc gcc gtg
336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

tac tac tgt gcc gag gac atg agc aac agc ggc tac ggc ctg ttc gac
384
Tyr Tyr Cys Ala Glu Asp Met Ser Asn Ser Gly Tyr Gly Leu Phe Asp
115 120 125

tac tgg ggc cag gga acc ctc gtg acc gtc agc tca gcc tcc acc aag
432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc
480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc
528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc
576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg
624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac
672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc
720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225 230 235 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa
768

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac
 816
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac
 864
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc
 912
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac
 960
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg
 1008
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca
 1056
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa
 1104
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac
 1152
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380
 cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc
 1200
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc
 1248
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag
1296

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc
1344

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc
1392

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa
1410

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 30

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 30

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr
35 40 45

Arg Ser Tyr Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Glu Asp Met Ser Asn Ser Gly Tyr Gly Leu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 31
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> được nhân hóa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(702)

<400> 31

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc
48

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

ggc gcg tac ggc gac atc cag atg acc cag agc cct agc agc ctg agc
96

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

gcc agc gtg ggc gac aga gtg acc atc acc tgt aaa gcc ggc cag aac
144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
35 40 45

gtg gac aac aat atc gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag gcc cct
192

Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

aag ctg ctg atc tac tac gcc agc aac cgg aac acc ggc gtg ccc agc
240

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

aga ttt tct ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg aca atc agc
288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

agc ctg cag ccc gag gac ttc gcc acc tac tac tgc cag aga atc agc
336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
100 105 110

aac agc ccc tac acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag cgt
384

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag cag
432

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tac
 480
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag tcc
 528
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac agc acc
 576
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac tac gag aag
 624
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc tcc ccc
 672
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt
 702
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 32
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 32

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
 35 40 45

Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
 100 105 110

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 33
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> được nhân hóa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 33
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc
 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

ggc gcg tac ggc gac atc cag atg acc cag agc cct agc agc ctg agc
 96
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

gcc agc gtg ggc gac aga gtg acc atc acc tgt aaa gcc ggc cag aac
 144
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
 35 40 45

gtg gac aac aat atc gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag agc ccc
 192
 Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

aag ctg ctg atc tac tac gcc agc aac cgg aac acc ggc gtg ccc agc
 240
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

aga ttt tcc ggc agc ggc tac ggc acc gac ttc acc ctg aca atc agc
 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

agc ctg cag ccc gag gac ttc gcc acc tac tac tgc cag aga atc agc
 336
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
 100 105 110

aac agc ccc tac acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag cgt
 384
 Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

115 120 125
 acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag cag
 432
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tac
 480
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag tcc
 528
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac agc acc
 576
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac tac gag aag
 624
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc tcc ccc
 672
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt
 702
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 34
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 34
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
 35 40 45

Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
 100 105 110

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 35
<211> 702
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> được nhân hóa

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(702)

<400> 35
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc
48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

ggc gcg tac ggc aac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg tct
96
Gly Ala Tyr Gly Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

gcc agc gtg ggc gac aga gtg acc atc aca tgc aag gcc ggc cag aac
144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
35 40 45

gtg gac aac aat atc gcc tgg tat cag aag aag ccc ggc cag tcc ccc
192
Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

aag ctg ctg atc tac tac gcc agc aac cgg aac acc ggc gtg ccc gac
240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

aga ttt tcc ggc gga ggc tac ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc
288
Arg Phe Ser Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

tcc ctg cag ccc gag gac ttc gcc ttc tac tac tgt cag cgg atc agc
336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
100 105 110

aac agc ccc tac acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag cgt
384

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag cag
432

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tac
480

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag tcc
528

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac agc acc
576

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac tac gag aag
624

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc tcc ccc
672

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt
702

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 36

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 37
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> được nhân hóa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 37
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc
 48

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

ggc gcg tac ggc gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc atg agc
 96

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 25 30

atc agc gtg ggc gac aga gtg acc atg acc tgc aag gcc ggc cag aac
 144

Ile Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
 35 40 45

gtg gac aac aat atc gcc tgg tat cag aag aag ccc ggc cag tcc ccc
 192

Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

aag ctg ctg atc tac tac gcc agc aac cgg aac acc ggc gtg ccc agc
 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

aga ttt tct ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg aca atc agc
 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

agc gtg cag ccc gag gac ttc gcc acc tac tac tgc cag aga atc agc
 336
 Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
 100 105 110

aac agc ccc tac acc ttc ggc cag ggc acc aag ctg gaa ctg aag cgt
 384
 Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125

acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag cag
 432
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tac
 480
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag tcc
 528
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac agc acc
 576
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac tac gag aag
 624
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc tcc ccc
 672
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt
 702
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 38
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 25 30

Ile Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
 35 40 45

Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
 100 105 110

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 39
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> được nhân hóa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 39
 atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc
 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

ggc gcg tac ggc aac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc atg agc
 96
 Gly Ala Tyr Gly Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 25 30

atc agc gtg ggc gac aga gtg acc atg acc tgc aag gcc ggc cag aac
 144
 Ile Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
 35 40 45

gtg gac aac aat atc gcc tgg tat cag aag aag ccc ggc cag tcc ccc
 192
 Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

aag ctg ctg atc tac tac gcc agc aac cgg aac acc ggc gtg ccc gac
 240
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

aga ttt tcc ggc gga ggc tac ggc acc gac ttc acc ctg aca atc agc
 288
 Arg Phe Ser Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

agc gtg cag ccc gag gac gcc gcc ttc tac tac tgt cag cgg atc agc
 336
 Ser Val Gln Pro Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
 100 105 110

aac agc ccc tac acc ttc ggc cag ggc acc aag ctg gaa ctg aag cgt
 384
 Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125

acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag cag
 432
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tac
 480
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag tcc
 528
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac agc acc
 576
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac tac gag aag
 624
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc tcc ccc
 672
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt
 702
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 40

<211> 234
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 25 30

Ile Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asn
 35 40 45

Val Asp Asn Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Val Gln Pro Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Ser
 100 105 110

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 42

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

Gly

<210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 43

Asp Leu Ile Asn Tyr Pro Gly Ile Gly Gly Phe Ala Phe
 1 5 10

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 44

Lys Ala Ser Gln Asn Val Tyr Asn Asn Ile Ala
 1 5 10

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 45

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 46

Gln Arg Leu Tyr Asn Ser Pro Pro Thr
 1 5

<210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 47

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

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 48

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

Gly

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 49

Asp Met Ser Asn Ser Gly Tyr Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 50

Lys Ala Gly Gln Asn Val Asp Asn Asn Ile Ala
 1 5 10

<210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 51

Tyr Ala Ser Asn Arg Asn Thr
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 52

Gln Arg Ile Ser Asn Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 53

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

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 54

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

Gly

<210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 55

Pro	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Trp	Phe	Thr	Tyr
1				5					10		

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 56

Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	His	Asn	Gly	Leu	Val
1				5					10	

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 57

Asn Ala Asn Ser Met His Thr
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 58

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 59

Gly Phe Thr Tyr Arg Thr Tyr Val Met Ala
1 5 10

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 60

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

Gly

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 61

Asp Met Leu Asn Gly Tyr Asn Ser Gln Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 62

Arg Ala Ser Gln Asn Val Asp Asn Thr Ile Ala
 1 5 10

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 63

Phe Ala Ser Asp Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 64

Gln Arg Ile Tyr Asn Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 65

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

<210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nâu (*Rattus norvegicus*)

<400> 66

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

Gly

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 67

Thr	Asp	His	Ser	Gly	Tyr	Arg	Phe	Thr	Tyr
1				5					10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 68

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Tyr	Asn	Ser	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 69

Asp	Ala	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr
1				5		

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Chuột nâu (Rattus norvegicus)

<400> 70

Gln Lys Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr

1

5

<210> 71
<211> 29
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> prime

<400> 71
ctccagagtt ccaggtcacg gtgactggc
29

<210> 72
<211> 28
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> prime

<400> 72
tcagtaacac tgtccaggac accatctc
28

<210> 73
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> prime

<400> 73
tataccgtcg acctctagct agagcttggc
30

<210> 74
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> prime

<400> 74

gctatggcag ggcctgccgc cccgacgttg
30

<210> 75
<211> 46
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> prime

<400> 75
ccagatgggt gctgagcgag gtgcagctgg tggagtctgg gggagg
46

<210> 76
<211> 46
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> prime

<400> 76
cttggtggag gctgagctga ctgtgaccat gactccttgg ccccag
46

<210> 77
<211> 48
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> prime

<400> 77
atctccggcg cgtacggcaa cattgtgatg acccagtctc ccaaattcc
48

<210> 78
<211> 45
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> prime

<400> 78

ggagggggcg gccacagccc gtttcagttc cagctcggtc ccagc
45

<210> 79
<211> 34
<212> DNA
<213> Loài người (Homo sapiens)

<400> 79
atgtgggagg ctcaattcct gggcttgctg tttc
34

<210> 80
<211> 34
<212> DNA
<213> Loài người (Homo sapiens)

<400> 80
gcccagagccc gagcccgagc cggagcagct ctga
34

<210> 81
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit

<400> 81
gagtatgtgt tgactgggtg ataactatcg
30

<210> 82
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit

<400> 82
gccatgacag attagccatg tctgcagcac
30

<210> 83
<211> 56

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 83

caggaccttt ttctaacctc ccttggaggg ctggggaggc ccggggccata gaggag
56

<210> 84

<211> 56

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 84

cctggagccg aggcagccag caggtctcag cagctccgcc cgcccgcccg cccgcc
56

<210> 85

<211> 1575

<212> DNA

<213> Loài người (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1575)

<400> 85

atg tgg gag gct cag ttc ctg ggc ttg ctg ttt ctg cag ccg ctt tgg
48

Met	Trp	Glu	Ala	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Pro	Leu	Trp
1				5				10						15	

gtg gct cca gtg aag cct ctc cag cca ggg gct gag gtc ccg gtg gtg
96

Val	Ala	Pro	Val	Lys	Pro	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Val	Pro	Val	Val
			20					25					30		

tgg gcc cag gag ggg gct cct gcc cag ctc ccc tgc agc ccc aca atc
144

Trp	Ala	Gln	Glu	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Pro	Cys	Ser	Pro	Thr	Ile
		35					40					45			

ccc ctc cag gat ctc agc ctt ctg cga aga gca ggg gtc act tgg cag
192

Pro	Leu	Gln	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly	Val	Thr	Trp	Gln
	50					55					60				

cat cag cca gac agt ggc ccg ccc gct gcc gcc ccc ggc cat ccc ctg
240

His	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

```

65                               70                               75                               80
gcc ccc ggc cct cac ccg gcg gcg ccc tcc tcc tgg ggg ccc agg ccc
288
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85                               90                               95

cgc cgc tac acg gtg ctg agc gtg ggt ccc gga ggc ctg cgc agc ggg
336
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100                               105                               110

agg ctg ccc ctg cag ccc cgc gtc cag ctg gat gag cgc ggc cgg cag
384
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115                               120                               125

cgc ggg gac ttc tcg cta tgg ctg cgc cca gcc cgg cgc gcg gac gcc
432
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130                               135                               140

ggc gag tac cgc gcc gcg gtg cac ctc agg gac cgc gcc ctc tcc tgc
480
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145                               150                               155                               160

cgc ctc cgt ctg cgc ctg ggc cag gcc tcg atg act gcc agc ccc cca
528
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
165                               170                               175

gga tct ctc aga gcc tcc gac tgg gtc att ttg aac tgc tcc ttc agc
576
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
180                               185                               190

cgc cct gac cgc cca gcc tct gtg cat tgg ttc cgg aac cgg ggc cag
624
Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
195                               200                               205

ggc cga gtc cct gtc cgg gag tcc ccc cat cac cac tta gcg gaa agc
672
Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
210                               215                               220

ttc ctc ttc ctg ccc caa gtc agc ccc atg gac tct ggg ccc tgg ggc
720
Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225                               230                               235                               240

```

tgc atc ctc acc tac aga gat ggc ttc aac gtc tcc atc atg tat aac
 768
 Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255

ctc act gtt ctg ggt ctg gag ccc cca act ccc ttg aca gtg tac gct
 816
 Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
 260 265 270

gga gca ggt tcc agg gtg ggg ctg ccc tgc cgc ctg cct gct ggt gtg
 864
 Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
 275 280 285

ggg acc cgg tct ttc ctc act gcc aag tgg act cct cct ggg gga ggc
 912
 Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 290 295 300

cct gac ctc ctg gtg act gga gac aat ggc gac ttt acc ctt cga cta
 960
 Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
 305 310 315 320

gag gat gtg agc cag gcc cag gct ggg acc tac acc tgc cat atc cat
 1008
 Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
 325 330 335

ctg cag gaa cag cag ctc aat gcc act gtc aca ttg gca atc atc aca
 1056
 Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
 340 345 350

gtg act ccc aaa tcc ttt ggg tca cct gga tcc ctg ggg aag ctg ctt
 1104
 Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
 355 360 365

tgt gag gtg act cca gta tct gga caa gaa cgc ttt gtg tgg agc tct
 1152
 Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
 370 375 380

ctg gac acc cca tcc cag agg agt ttc tca gga cct tgg ctg gag gca
 1200
 Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
 385 390 395 400

cag gag gcc cag ctc ctt tcc cag cct tgg caa tgc cag ctg tac cag
 1248

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
 405 410 415
 ggg gag agg ctt ctt gga gca gca gtg tac ttc aca gag ctg tct agc
 1296
 Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
 420 425 430
 cca ggt gcc caa cgc tct ggg aga gcc cca ggt gcc ctc cca gca ggc
 1344
 Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
 435 440 445
 cac ctc ctg ctg ttt ctc atc ctt ggt gtc ctt tct ctg ctc ctt ttg
 1392
 His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 450 455 460
 gtg act gga gcc ttt ggc ttt cac ctt tgg aga aga cag tgg cga cca
 1440
 Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
 465 470 475 480
 aga cga ttt tct gcc tta gag caa ggg att cac cct ccg cag gct cag
 1488
 Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
 485 490 495
 agc aag ata gag gag ctg gag caa gaa ccg gag ccg gag ccg gag ccg
 1536
 Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 505 510
 gaa ccg gag ccc gag ccc gag ccc gag ccg gag cag ctc
 1575
 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 515 520 525

 <210> 86
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Loài người (Homo sapiens)

 <400> 86

 Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15

 Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 25 30

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

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
 245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
 260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
 275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
 290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
 305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
 325 330 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
 340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
 355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
 370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
 385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
 405 410 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
 420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
 435 440 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
 465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
 485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 515 520 525