



(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)



1-0036680

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2015-00400

(22) 02/07/2013

(86) PCT/US2013/048999 02/07/2013

(87) WO2014/008218 09/01/2014

(30) 61/667,058 02/07/2012 US

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/05/2015 326A

(73) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)

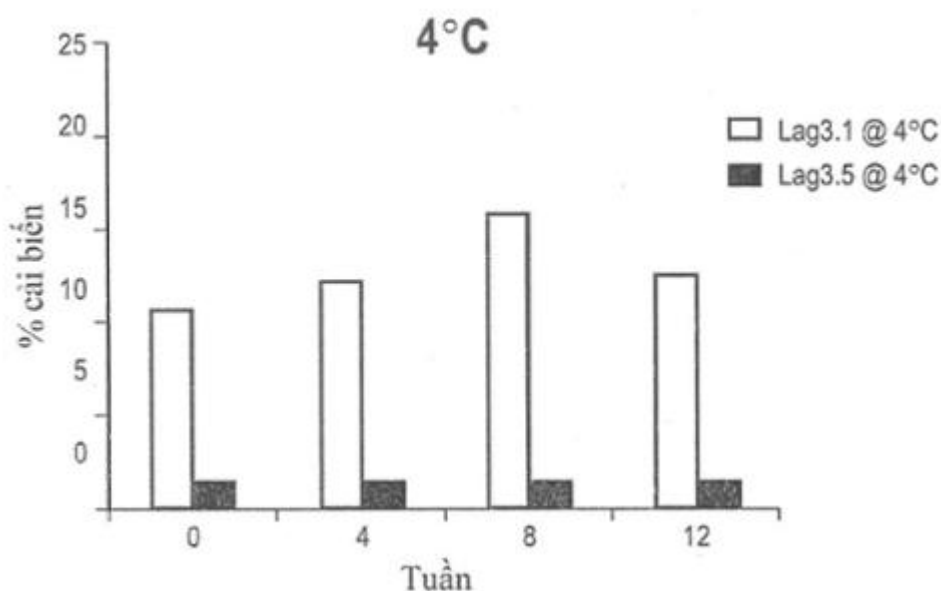
P.O. Box 4000, Route 206 and ProvinceLine Road, Princeton, New Jersey 08543-4000, United States of America

(72) LONBERG, Nils (US); SRINIVASAN, Mohan (IN).

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

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG PHÂN LẬP, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với gen hoạt hóa tế bào lympho-3 của người (LAG-3-lymphocyte activation gene-3), trong đó vùng xác định bổ sung 1 (CDR1-complementarity determining region 1), vùng CDR2, và vùng CDR3 chuỗi nặng chứa các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, và SEQ ID NO.17, và vùng CDR1, vùng CDR2, và vùng CDR3 chuỗi nhẹ chứa các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.19, và SEQ ID NO.20; phân tử đặc hiệu kép; thể tiếp hợp miễn dịch; dược phẩm chứa kháng thể này; axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể này; vector biểu hiện chứa axit nucleic này; tế bào vật chủ chứa vector biểu hiện này; và phương pháp sản xuất kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với gen hoạt hóa tế bào lympho-3 của người (LAG-3-lymphocyte activation gene-3), trong đó vùng xác định bổ sung 1 (CDR1-complementarity determining region 1), vùng CDR2, và vùng CDR3 chuỗi nặng chứa các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.16, và SEQ ID NO.17, và vùng CDR1, vùng CDR2, và vùng CDR3 chuỗi nhẹ chứa các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.19, và SEQ ID NO.20; phân tử đặc hiệu kép; thể tiếp hợp miễn dịch; dược phẩm chứa kháng thể này; axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể này; vectơ biểu hiện chứa axit nucleic này; tế bào vật chủ chứa vectơ biểu hiện này; và phương pháp sản xuất kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các dược chất kháng thể là một trong số các phân khúc phát triển nhanh nhất của ngành công nghiệp dược phẩm. Để duy trì hiệu lực (tức là hoạt tính) và giảm thiểu khả năng sinh miễn dịch, các kháng thể và các dược chất protein khác phải được bảo vệ khỏi bị phân hủy vật lý và hóa học trong khi sản xuất và bảo quản. Thực vậy, một trong những khó khăn chủ yếu trong việc phát triển các phép điều trị bằng kháng thể là đáp ứng sinh miễn dịch tiềm tàng khi dùng có thể dẫn đến thanh thải nhanh hoặc thậm chí gây ra các tác dụng phụ đe dọa đến tính mạng như sốc phản vệ. Các yếu tố khác nhau ảnh hưởng đến khả năng sinh miễn dịch của kháng thể như các đặc tính sinh hóa của nó (ví dụ, độ tinh khiết, độ ổn định, hoặc độ tan), các yếu tố lâm sàng (ví dụ, liều, đường đưa thuốc, tính phức tạp của bệnh, hoặc đặc thù của đối tượng bị bệnh), và việc điều trị đồng thời bằng các chất khác (Swann et al. (2008) *Curr Opinion Immunol* 20:493-499).

Khả năng sinh miễn dịch của kháng thể và/hoặc làm mất hoạt tính của kháng thể thường có liên quan đến phản ứng khử amit. Khử amit là quá trình phân hủy hóa học xảy ra tự phát trong các protein (ví dụ, kháng thể). Phản ứng khử amit loại bỏ nhóm chức amit khỏi gốc axit amin, như asparagin và glutamin, do đó làm mất chuỗi bên chứa amit của nó. Điều này, sau đó, gây ra các biến đổi cấu trúc và sinh học trong toàn bộ protein, do đó, tạo ra các dạng không đồng nhất của kháng thể. Khử amit là một trong số các biến

đổi sau dịch mã phổ biến nhất xảy ra trong các dược chất kháng thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

Ví dụ, tính không đồng nhất trong chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng h1B4 (kháng thể kháng CD18 nhân tạo) do phản ứng khử amit trong khi nuôi cấy tế bào đã được báo cáo bởi Tsai et al. (*Pharm Res* 10(11):1580 (1993)). Ngoài ra, việc giảm/mất hoạt tính sinh học do phản ứng khử amit là vấn đề đã được thừa nhận. Ví dụ, Kroon et al. đã mô tả một số vị trí khử amit trong dược chất kháng thể OKT3, và đã báo cáo rằng các mẫu của lô sản phẩm OKT3 (có tuổi từ 14 tháng đến 3 năm) đã bị giảm hoạt tính xuống dưới 75% (*Pharm Res* 9(11):1386 (1992), trang 1389, cột thứ hai). Ngoài ra, các mẫu OKT3 chứa lượng lớn peptit oxy hóa trong bản đồ của chúng đã giảm đáng kể hoạt tính trong thử nghiệm hiệu lực gắn kết kháng nguyên (trang 1390, cột thứ nhất). Các tác giả đã kết luận rằng các vị trí đặc hiệu của biến đổi hóa học xảy ra khi bảo quản OKT3 được nhận diện bằng cách lập bản đồ peptit và liên quan đến các thay đổi quan sát được trong phân tích hóa học và thử nghiệm sinh học của kháng thể (trang 1392, cột thứ nhất). Việc mất hoạt tính sinh học cũng được thấy ở nhiều protein điều trị bị khử amit khác, bao gồm deoxyribonucleaza tái tổ hợp của người (Cacia et al. (1993) *J. Chromatogr.* 634:229-239) và CD4 hòa tan tái tổ hợp (Teshima et al. (1991) *Biochemistry* 30:3916-3922).

Nhìn chung, phản ứng khử amit gây ra vấn đề đáng kể và không thể đoán trước được đối với ngành công nghiệp dược phẩm. Các biện pháp giám sát tính biến đổi gây ra bởi phản ứng khử amit trong phép điều trị bằng kháng thể, cũng như những quan tâm của FDA liên quan đến tính biến đổi này, làm tăng chi phí và làm chậm quá trình thử nghiệm lâm sàng. Ngoài ra, các biến đổi nhằm vấn đề này, bao gồm thay đổi các điều kiện (ví dụ, nhiệt độ, độ pH, và loại tế bào) liên quan đến việc sản xuất tái tổ hợp và/hoặc biến đổi các axit amin dễ bị khử amit (ví dụ, gây đột biến định hướng vị trí) có thể ảnh hưởng tiêu cực đến độ ổn định và hoạt tính, đặc biệt là khi các thay đổi này được tạo ra trong vùng xác định bổ sung (complementarity determining region-CDR) của kháng thể. Do đó, vẫn cần có các biện pháp làm ổn định hơn các dược chất kháng thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập (ví dụ, kháng thể đơn dòng của người) gắn kết với LAG-3 (ví dụ, LAG-3 của người) và có độ ổn định vật lý được tối ưu hóa so với các kháng thể kháng LAG-3 đã biết. Cụ thể, sáng chế đề cập

đến kháng thể 25F7 dạng cải biến (US 2011/0150892 A1) có độ ổn định nhiệt và hóa học được cải thiện một cách đáng kể so với kháng thể chưa được cải biến. Đặc biệt, bằng cách biến đổi vùng gắn kết có tính quyết định của vùng CDR2 chuỗi nặng của kháng thể 25F7, đã thấy rằng kháng thể được cải biến có độ ổn định vật lý và nhiệt cao hơn đáng kể, mức độ khử amit giảm, tính thuận nghịch nhiệt cao hơn, và mức độ kết tập thấp hơn. Đồng thời, đã bất ngờ quan sát thấy rằng kháng thể được cải biến vẫn có ái lực gắn kết với LAG-3 của người và hoạt tính chức năng cao tương đương kháng thể chưa được cải biến, bao gồm khả năng ức chế gắn kết của LAG-3 với phân tử tương thích mô chính nhóm II và kích thích các đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Việc tăng đáng kể độ ổn định và duy trì hoạt tính gắn kết/sinh học của kháng thể được cải biến là bất ngờ, đặc biệt là xét về tính xác định của các vùng CDR với chức năng kháng thể.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng, bao gồm phát hiện protein LAG-3 và kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên ở đối tượng mang khối u hoặc mang virus.

Vùng CDR1, vùng CDR2, và vùng CDR3 chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng phân lập theo sáng chế, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.16, và SEQ ID NO.17. Vùng CDR1, vùng CDR2, và vùng CDR3 chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng phân lập theo sáng chế, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.19, và SEQ ID NO.20. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng phân lập (ví dụ, kháng thể của người) theo sáng chế, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12. Theo một phương án khác, kháng thể này còn bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14.

Theo một phương án ưu tiên, kháng thể này có các đặc tính vật lý tăng (tức là độ ổn định nhiệt và hóa học) so với kháng thể 25F7, trong khi vẫn vẫn có ái lực gắn kết với LAG-3 của người ít nhất là giống như 25F7. Ví dụ, kháng thể này có mức độ biến đổi trình tự giảm trong vùng CDR2 chuỗi nặng do sự khử amit, so với kháng thể 25F7, ví dụ mức độ biến đổi trình tự axit amin khoảng 2,5% hoặc nhỏ hơn sau 12 tuần ở nhiệt độ 4°C (tức là thông qua các nghiên cứu về độ ổn định theo “thời gian thực” như được mô tả trong sáng chế) và/hoặc mức độ biến đổi trình tự axit amin khoảng 12,0% hoặc nhỏ hơn

sau 12 tuần ở nhiệt độ 40°C (tức là trong các điều kiện lão hóa cấp tốc, như được mô tả trong sáng chế), trong khi vẫn duy trì được ái lực gắn kết với LAG-3 của người với hằng số K_D ít nhất bằng 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn (tốt hơn nếu hằng số K_D bằng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, hằng số K_D bằng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, hoặc hằng số K_D bằng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn). Theo một phương án khác, kháng thể này có mức độ thuận nghịch bởi nhiệt ít nhất là khoảng 40% trong PBS ở độ pH bằng 8,0.

Theo một phương án khác, kháng thể này có nhiệt độ nóng chảy cao hơn (thể hiện độ ổn định *in vivo* cao hơn), so với kháng thể chưa được cải biến (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Theo một phương án, kháng thể này có T_{M1} (nhiệt độ duỗi mạch ban đầu) lớn hơn 60°C, ví dụ lớn hơn 65°C, hoặc lớn hơn 70°C. Nhiệt độ nóng chảy của kháng thể có thể được đo bằng phương pháp đo nhiệt lượng quét vi sai (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) hoặc phương pháp quang phổ lưỡng sắc tròn (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

Theo một phương án khác, kháng thể này được đặc trưng bởi khả năng chống phân hủy nhanh của nó. Mức độ phân hủy của kháng thể có thể được đo bằng phương pháp điện di mao quản (capillary electrophoresis - CE) và MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

Theo một phương án khác, kháng thể này có mức độ kết tập tối thiểu, ví dụ mức độ kết tập bằng 25% hoặc nhỏ hơn, như bằng 20% hoặc nhỏ hơn, bằng 15% hoặc nhỏ hơn, bằng 10% hoặc nhỏ hơn, bằng 5% hoặc nhỏ hơn, hoặc bằng 4% hoặc nhỏ hơn. Hiện tượng kết tập có thể dẫn đến hoạt hóa đáp ứng miễn dịch không mong muốn và/hoặc các đặc tính dược động học thay đổi hoặc bất lợi. Mức độ kết tập có thể được đo bằng một số phương pháp, bao gồm phương pháp sắc ký cột loại cỡ (size-exclusion column - SEC), phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC), và phương pháp tán xạ ánh sáng.

Theo một phương án khác, kháng thể này còn có ít nhất một trong các đặc tính sau: (a) gắn kết với LAG-3 của khi; (b) không gắn kết với LAG-3 của chuột; (c) ức chế gắn kết của LAG-3 với phân tử tương thích mô chính (major histocompatibility - MHC) nhóm II; và (d) kích thích đáp ứng miễn dịch, đặc biệt là đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Tốt hơn nếu kháng thể này có ít nhất hai trong số các đặc tính (a), (b), (c) và (d).

Tốt hơn nữa nếu kháng thể này có ít nhất ba trong số các đặc tính (a), (b), (c) và (d).
Thậm chí tốt hơn nữa nếu kháng thể này có toàn bộ bốn đặc tính (a), (b), (c) và (d).

Theo một phương án khác, kháng thể này kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, như sản sinh interleukin-2 trong đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Theo các phương án khác, kháng thể này kích thích đáp ứng miễn dịch, như đáp ứng kháng khối u (ví dụ, ức chế sinh trưởng khối u trong mô hình ghép khối u *in vivo*) hoặc đáp ứng tự miễn (ví dụ, phát triển bệnh đái tháo đường ở chuột NOD).

Theo một phương án khác, kháng thể này gắn kết với epitop của LAG-3 của người chứa trình tự axit amin PGHPLAPG (SEQ ID NO.21). Theo một phương án khác, kháng thể này gắn kết với epitop của LAG-3 của người chứa trình tự axit amin HPAAPSSW (SEQ ID NO.22) hoặc PAAPSSWG (SEQ ID NO.23).

Theo các phương án khác, kháng thể này nhuộm màu mô tuyến yên bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, hoặc không nhuộm màu mô tuyến yên bằng phương pháp hóa mô miễn dịch.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể có chiều dài đầy đủ, ví dụ isotyp IgG1, isotyp IgG2 hoặc isotyp IgG4, tùy ý có đột biến serin thành prolin trong vùng bản lề của vùng hằng định chuỗi nặng (ở vị trí tương ứng với vị trí 241 như được mô tả trong Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108), sao cho tính không đồng nhất của cầu liên kết disulfua liên chuỗi nặng được giảm hoặc loại bỏ. Theo một khía cạnh khác, isotyp vùng hằng định là IgG4 có đột biến ở gốc axit amin 228, ví dụ S228P. Theo cách khác, các kháng thể này có thể là mảnh kháng thể, như mảnh Fab, mảnh Fab' hoặc mảnh Fab'₂, hoặc kháng thể chuỗi đơn.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể này (hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó) là một phần của thể tiếp hợp miễn dịch chứa được chất, ví dụ độc tố gây độc tế bào hoặc đồng vị phóng xạ, được gắn kết với kháng thể này. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là một phần của phân tử đặc hiệu kép chứa gốc chức thứ hai (ví dụ, kháng thể thứ hai) có độ đặc hiệu gắn kết khác với kháng thể này, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế, hoặc phân gán kết kháng nguyên của nó, thể tiếp hợp miễn dịch hoặc phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế, tùy ý được bào chế cùng với chất mang được dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gán kết kháng nguyên của nó (ví dụ, vùng biến đổi và/hoặc CDR), cũng như vector biểu hiện chứa axit nucleic này và tế bào vật chủ chứa vector biểu hiện này. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể kháng LAG-3 bằng cách sử dụng tế bào vật chủ chứa vector biểu hiện này, và có thể bao gồm các bước (i) biểu hiện kháng thể này trong tế bào vật chủ và (ii) phân lập kháng thể này từ tế bào vật chủ.

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả chi tiết và các ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, phần mô tả và các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1A là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO.1) và trình tự axit amin (SEQ ID NO.2) của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng của người 25F7. Vùng CDR1 (SEQ ID NO.5), vùng CDR2 (SEQ ID NO.6) và vùng CDR3 (SEQ ID NO.7) được phân định và các đoạn dòng mầm V, D và J được thể hiện. Các vùng CDR được phân định bằng cách sử dụng hệ thống Kabat (Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Fig.1B là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO.3) và trình tự axit amin (SEQ ID NO.4) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa của kháng thể đơn dòng của người 25F7. Vùng CDR1 (SEQ ID NO.8), vùng CDR2 (SEQ ID NO.9) và vùng CDR3 (SEQ ID NO.10) được phân định và các đoạn dòng mầm V và J được thể hiện. Các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể 25F7 tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.32 và SEQ ID NO.34.

Fig.2A là hình vẽ thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO.12) của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng LAG3.5. Vùng CDR1 (SEQ ID NO.15), vùng CDR2 (SEQ ID NO.16) và vùng CDR3 (SEQ ID NO.17) được phân định. Các trình tự axit amin

của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể LAG3.5 tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.35 và SEQ ID NO.37.

Fig.2B là hình vẽ thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO.13) và trình tự axit amin (SEQ ID NO.14) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa của kháng thể đơn dòng LAG3.5. Vùng CDR1 (SEQ ID NO.18), vùng CDR2 (SEQ ID NO.19) và vùng CDR3 (SEQ ID NO.20) được phân định.

Fig.3 là hình vẽ thể hiện các trình tự axit amin của trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 của các biến thể LAG-3, tức là LAG3.5 (SEQ ID NO.42), LAG3.6 (SEQ ID NO.43), LAG3.7 (SEQ ID NO.44), và LAG3.8 (SEQ ID NO.45), so với trình tự axit amin của trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 của kháng thể 25F7 (LAG3.1) (SEQ ID NO.41) và trình tự dòng mầm của người tương ứng (SEQ ID NO.27). Vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 của LAG3.5 khác với vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 của kháng thể 25F7 ở arginin (R) ở vị trí 54 (so với asparagin (N)) và serin (S) ở vị trí 56 (so với asparagin (N)). Các CDR còn lại của LAG3.5 và kháng thể 25F7 là giống nhau. Fig.3 cũng thể hiện SEQ ID NO.40.

Fig.4A và Fig.4B là đồ thị thể hiện hoạt tính gắn kết (tương ứng là EC_{50} và ái lực) của kháng thể LAG3.1 (25F7), kháng thể LAG3.2, kháng thể LAG3.5, kháng thể LAG3.6, kháng thể LAG3.7, và kháng thể LAG3.8 với tế bào T biểu hiện CD4 của người được hoạt hóa. Fig.4B tương ứng thể hiện các SEQ ID NO.41, SEQ ID NO.42, SEQ ID NO.45, SEQ ID NO.44, và SEQ ID NO.43, theo thứ tự xuất hiện.

Fig.5A, Fig.5B, Fig.5C, Fig.5D, và Fig.5E là đồ thị thể hiện các đường cong nóng chảy nhiệt (tức là độ ổn định nhiệt) tương ứng của kháng thể LAG3.1 (25F7), kháng thể LAG3.5, kháng thể LAG3.6, kháng thể LAG3.7, và kháng thể LAG3.8.

Fig.6A, Fig.6B, Fig.6C, Fig.6D, và Fig.6E là đồ thị thể hiện các đường cong thuận nghịch nhiệt (tức là độ ổn định nhiệt) tương ứng của kháng thể LAG3.1 (25F7), kháng thể LAG3.5, kháng thể LAG3.6, kháng thể LAG3.7, và kháng thể LAG3.8.

Fig.7 là đồ thị thể hiện hoạt tính gắn kết của kháng thể LAG3.1 (25F7) và kháng thể LAG3.5 với tế bào T biểu hiện CD4 của người được hoạt hóa và gắn kết kháng nguyên (Biacore).

Fig.8 là hình vẽ thể hiện các kết quả lập bản đồ peptit bằng phương pháp khối phổ (độ biến đổi hóa học/độ ổn định phân tử) đối với kháng thể LAG3.1 (25F7) và kháng thể LAG3.5 thể hiện quá trình khử amit và đồng phân hóa sau khi ủ trong 5 ngày trong các điều kiện lão hóa cấp tốc như được mô tả trong sáng chế. Fig.8 tương ứng thể hiện SEQ ID NO.46- SEQ ID NO.52 theo thứ tự xuất hiện.

Fig.9 là đồ thị so sánh đặc tính thân nước của kháng thể LAG3.1 (25F7) và kháng thể LAG3.5.

Fig.10A, Fig.10B, Fig.10C, và Fig.10D là đồ thị so sánh ái lực và độ ổn định vật lý (tức là độ ổn định nhiệt và hóa học) của kháng thể LAG3.1 và kháng thể LAG3.5 ở nhiệt độ 4°C và nhiệt độ 40°C, tức là nghiên cứu độ ổn định ở cả điều kiện lão hóa cấp tốc và “thời gian thực”, như được mô tả trong sáng chế.

Fig.11A và Fig.11B là đồ thị so sánh tỷ lệ cải biến trình tự axit amin của kháng thể LAG3.1 và kháng thể LAG3.5 ở nhiệt độ 4°C và nhiệt độ 40°C.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn, trước tiên một số thuật ngữ được định nghĩa. Các định nghĩa bổ sung được đưa ra trong toàn bộ phần mô tả chi tiết.

Thuật ngữ “25F7”, “kháng thể 25F7”, “kháng thể LAG3.1”, và “LAG3.1” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể kháng LAG-3 của người được mô tả trong US2011/0150892 A1. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.1) mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 25F7 (LAG3.1) và trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO.2) được thể hiện trên Fig.1A (với các trình tự CDR được gọi tên tương ứng là các SEQ ID NO.4, 5, và 7). Trình tự nucleotit (SEQ ID NO.3) mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 25F7 (LAG3.1) và trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO.4) được thể hiện trên Fig.1B (với các trình tự CDR được gọi tên tương ứng là SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, và SEQ ID NO.10).

Thuật ngữ “LAG-3” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gen hoạt hóa tế bào lympho-3. Thuật ngữ “LAG-3” bao gồm các gen biến thể, các gen đồng chức năng, các gen tương đồng, các gen đồng đẳng và các gen bản sao. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu với protein LAG-3 của người có thể, trong một số trường hợp, phản ứng chéo với protein LAG-3 từ loài không phải người. Theo các phương án khác, các kháng thể đặc hiệu với

protein LAG-3 của người có thể là đặc hiệu hoàn toàn với protein LAG-3 của người và có thể không biểu hiện khả năng phản ứng chéo loài hoặc các loại khác, hoặc có thể phản ứng chéo với LAG-3 từ một số loài khác nhất định nhưng không phải toàn bộ các loài khác (ví dụ, phản ứng chéo với LAG-3 của khỉ nhưng không phản ứng chéo với LAG-3 của chuột). Thuật ngữ “LAG-3 của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự LAG-3 của người, như trình tự axit amin đầy đủ của LAG-3 của người có số truy cập ngân hàng gen NP_002277 (SEQ ID NO.29). Thuật ngữ “LAG-3 của chuột” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự LAG-3 của chuột, như trình tự axit amin đầy đủ của LAG-3 của chuột có số truy cập ngân hàng gen NP_032505. Trong lĩnh vực này, LAG-3 cũng được gọi là, ví dụ CD223. Trình tự LAG-3 của người có thể khác với LAG-3 của người trong ngân hàng gen có số truy cập NP_002277 ở việc có, ví dụ các đột biến bảo thủ hoặc các đột biến trong vùng không được bảo thủ và LAG-3 này có chức năng sinh học gần giống như LAG-3 của người trong ngân hàng gen có số truy cập NP_002277. Ví dụ, chức năng sinh học của LAG-3 của người là có epitop trong miền ngoại bào của LAG-3, epitop này được gắn kết đặc hiệu bởi kháng thể theo sáng chế hoặc chức năng sinh học của LAG-3 của người là gắn kết với các phân tử MHC nhóm II.

Thuật ngữ “LAG-3 của khỉ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein LAG-3 được biểu hiện bởi khỉ Cựu Thế giới và khỉ Tân Thế giới, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, LAG-3 của khỉ đuôi dài và LAG-3 của khỉ nâu. Trình tự axit amin điển hình của LAG-3 của khỉ là trình tự axit amin của LAG-3 của khỉ nâu còn được lưu giữ với số truy cập ngân hàng gen XM_001108923. Trình tự axit amin điển hình khác của LAG-3 của khỉ là trình tự khác của khỉ nâu thuộc dòng vô tính pa23-5 như được mô tả trong US 2011/0150892 A1. Trình tự khác của khỉ nâu này có khác biệt một axit amin, ở vị trí 419, so với trình tự được lưu giữ trong ngân hàng gen.

Trình tự LAG-3 của người cụ thể thường sẽ có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 90% so với LAG-3 của người trong ngân hàng gen có số truy cập NP_002277 và chứa các gốc axit amin xác định trình tự axit amin là của người khi so với các trình tự axit amin LAG-3 của các loài khác (ví dụ, chuột). Trong một số trường hợp, LAG-3 của người có thể có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 95%, hoặc thậm chí ít nhất là 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với LAG-3 trong ngân hàng gen có số truy cập NP_002277. Theo một số phương án, trình tự LAG-3 của người sẽ có khác biệt không quá 10 axit

amin so với trình tự LAG-3 trong ngân hàng gen có số truy cập NP_002277. Theo một số phương án, LAG-3 của người có thể có khác biệt không quá 5, hoặc thậm chí không quá 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin so với trình tự LAG-3 trong ngân hàng gen có số truy cập NP_002277. Phần trăm đồng nhất có thể được xác định như được mô tả trong sáng chế.

Thuật ngữ “đáp ứng miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tác động của, ví dụ tế bào lympho, tế bào trình diện kháng nguyên, tế bào thực bào, bạch cầu hạt, và các đại phân tử hòa tan được tạo ra bởi các tế bào trên hoặc gan (bao gồm các kháng thể, xytokin, và bổ thể) dẫn đến tổn thương chọn lọc, phá hủy, hoặc thải trừ khỏi cơ thể người các mầm bệnh xâm nhập, các tế bào hoặc mô bị nhiễm mầm bệnh, các tế bào ung thư, hoặc, trong các trường hợp viêm tự miễn hoặc bệnh lý, các tế bào hoặc mô bình thường của người.

Thuật ngữ “đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đáp ứng của tế bào T gây ra do sự kích thích tế bào T bởi kháng nguyên đặc hiệu với tế bào T này. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các đáp ứng của tế bào T khi kích thích đặc hiệu bởi kháng nguyên bao gồm sự tăng sinh và sản sinh xytokin (ví dụ, sản sinh IL-2).

Thuật ngữ “kháng thể” được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể nguyên vẹn và mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ (*tức là* “mảnh gắn kết kháng nguyên”) hoặc các chuỗi đơn của nó. Các kháng thể nguyên vẹn là các glycoprotein bao gồm ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (trong bản mô tả này được viết tắt là V_H) và vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm ba miền, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được viết tắt là V_L) và vùng hằng định của chuỗi nhẹ. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền, C_L . Các vùng V_H và V_L có thể còn được chia nhỏ thành các vùng có khả năng siêu biến, được gọi là vùng xác định bổ sung (complementarity determining region - CDR), rải rác là các vùng được bảo thủ hơn, được gọi là vùng khung (framework region - FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết tương tác với kháng nguyên. Vùng hằng định của các kháng thể có thể là trung gian gắn kết globulin

miễn dịch với mô của vật chủ hoặc các yếu tố, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu ứng) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ thống bổ thể cổ điển.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể” hoặc “phần kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể vẫn có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, protein LAG-3). Đã thấy rằng chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết bao hàm trong thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một chứa các miền V_L , V_H , C_L và C_{H1} ; (ii) mảnh $F(ab')_2$, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được gắn kết bằng cầu liên kết disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh F_d chứa các miền V_H và C_{H1} ; (iv) mảnh F_v chứa các miền V_H và C_{H1} ; (v) mảnh F_v chứa các miền V_L và V_H của một nhánh của kháng thể, (vi) mảnh dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), chứa miền V_H ; (vii) vùng xác định bổ sung (CDR) được phân lập; và (viii) kháng thể có kích cỡ nano, vùng biến đổi chuỗi nặng chứa một miền biến đổi và hai miền hằng định. Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh F_v , V_L và V_H , được mã hóa bởi các gen riêng rẽ, chúng có thể được nối, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng cầu liên kết tổng hợp cho phép chúng được tạo ra dưới dạng chuỗi protein đơn trong đó các vùng V_L và V_H cặp đôi để tạo ra phân tử có hóa trị một (đã biết là F_v chuỗi đơn (single chain F_v - scFv); ví dụ, xem Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; và Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được bao gồm trong thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể. Các mảnh kháng thể này được tạo ra bằng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, và các mảnh này được sàng lọc tính hữu ích theo cách giống như các kháng thể nguyên vẹn.

Thuật ngữ “kháng thể phân lập” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể gần như được phân tách khỏi các kháng thể khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể phân lập gắn kết đặc hiệu với protein LAG-3 là gần như được phân tách khỏi các kháng thể gắn kết đặc biệt với các kháng nguyên không phải là protein LAG-3). Tuy nhiên, kháng thể phân lập gắn kết đặc hiệu với protein LAG-3 của người có thể có khả năng phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như protein LAG-3 từ loài khác. Ngoài ra, kháng thể phân lập có thể gần như được phân tách khỏi các nguyên liệu và/hoặc các chất hóa học khác của tế bào.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc “chế phẩm kháng thể đơn dòng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thành phẩm của các phân tử kháng thể của chế phẩm đơn phân tử. Chế phẩm kháng thể đơn dòng biểu thị tính đặc hiệu và ái lực gắn kết đơn đối với epitop cụ thể.

Thuật ngữ “kháng thể của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể có vùng biến đổi trong đó cả vùng khung và vùng CDR có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Ngoài ra, nếu kháng thể này chứa vùng hằng định, thì vùng hằng định này cũng có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Kháng thể của người theo sáng chế có thể chứa các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến sinh dưỡng *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể của người”, được sử dụng trong bản mô tả, không được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các kháng thể trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của một loài động vật có vú khác, như chuột, đã được ghép trên các trình tự khung của người.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể biểu thị độ đặc hiệu gắn kết đơn, có vùng biến đổi trong đó cả vùng khung và vùng CDR có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng của người được tạo ra bằng tế bào lai chứa tế bào B thu được từ động vật chuyển gen không phải người, ví dụ chuột chuyển gen, có hệ gen chứa gen chuyển của chuỗi nặng của người và gen chuyển của chuỗi nhẹ được dung hợp với tế bào được bất tử hóa.

Thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các kháng thể của người được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng cách tái tổ hợp, như (a) kháng thể phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) là chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể đối với các gen globulin miễn dịch của người hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó (được mô tả thêm dưới đây), (b) kháng thể phân lập từ tế bào vật chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể của người, ví dụ từ tế bào chuyển nạp, (c) kháng thể phân lập từ thư viện kháng thể của người kết hợp tái tổ hợp, và (d) kháng thể được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng cách khác bất kỳ liên quan đến việc ghép nối các trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự

ADN khác. Kháng thể tái tổ hợp của người này có vùng biến đổi trong đó vùng khung và vùng CDR có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Tuy nhiên, theo một số phương án, kháng thể tái tổ hợp của người này có thể được đem gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi trình tự Ig động vật chuyển gen sang người được sử dụng, gây đột biến sinh dưỡng *in vivo*) và do đó, các trình tự axit amin của vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, trong khi có nguồn gốc từ và liên quan đến các trình tự V_H và V_L dòng mầm của người, có thể không tồn tại tự nhiên trong danh sách dòng mầm của kháng thể của người *in vivo*.

Thuật ngữ “isotyp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nhóm kháng thể (ví dụ, IgM hoặc IgG1) được mã hóa bởi các gen của vùng hằng định chuỗi nặng.

Thuật ngữ “kháng thể nhận diện kháng nguyên” và “kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên”, và “kháng thể gắn kết đặc biệt với kháng nguyên” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả.

Thuật ngữ “có nguồn gốc kháng thể của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng được cải biến bất kỳ của kháng thể của người, ví dụ thể tiếp hợp của kháng thể này và một chất hoặc kháng thể khác.

Thuật ngữ “kháng thể nhân tạo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của một loài động vật có vú khác, như chuột, được ghép vào trình tự khung của người. Các cải biến bổ sung ở vùng khung có thể được thực hiện trong các trình tự khung của người.

Thuật ngữ “kháng thể khảm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể trong đó các trình tự vùng biến đổi có nguồn gốc từ một loài và các trình tự vùng hằng định có nguồn gốc từ một loài khác, như kháng thể trong đó các trình tự vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể của chuột và các trình tự vùng hằng định có nguồn gốc từ kháng thể của người.

Thuật ngữ “kháng thể gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể gắn kết với protein LAG-3 của người (và có thể với protein LAG-3 từ một hoặc nhiều loài không phải người) nhưng gần như không gắn kết với các protein không phải LAG-3. Tốt hơn nếu, kháng thể gắn kết với protein LAG-3 của người với “ái lực cao”, cụ thể là với hằng số K_D bằng 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu

bằng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ “gắn như không gắn kết với protein hoặc tế bào” được sử dụng trong bản mô tả, có nghĩa là không gắn kết hoặc không gắn kết với ái lực cao với protein hoặc tế bào, *tức là* gắn kết với protein hoặc tế bào với K_D bằng 1×10^{-6} M hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 1×10^{-5} M hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 1×10^{-4} M hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 1×10^{-3} M hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 1×10^{-2} M hoặc lớn hơn.

Thuật ngữ “ K_{assoc} ” hoặc “ K_a ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hằng số tốc độ liên kết của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể, còn thuật ngữ “ K_{dis} ” hoặc “ K_d ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hằng số tốc độ phân ly của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Thuật ngữ “ K_D ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hằng số phân ly, tính bằng tỷ lệ của K_d và K_a (*tức là* K_d/K_a) và được thể hiện dưới dạng nồng độ mol (M). Các giá trị K_D của kháng thể có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Phương pháp được ưu tiên để xác định hằng số K_D của kháng thể là phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, tốt hơn nếu hệ thống cảm biến sinh học, như hệ thống Biacore®.

Thuật ngữ “ái lực cao” đối với kháng thể IgG chỉ kháng thể có K_D bằng 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nếu bằng 5×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn và tốt hơn nữa nếu bằng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn đối với kháng nguyên đích. Tuy nhiên, việc gắn kết “ái lực cao” có thể thay đổi đối với các isotyp kháng thể khác. Ví dụ, gắn kết “ái lực cao” đối với isotyp IgM chỉ kháng thể có K_D bằng 10^{-6} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nếu bằng 10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ “khử amit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình phân hủy hóa học xảy ra tự phát trong các protein (ví dụ, kháng thể). Việc khử amit loại bỏ nhóm chức amit khỏi gốc axit amin, như asparagin và glutamin, do đó, ảnh hưởng đến chuỗi bên chứa amit của nó. Cụ thể, chuỗi bên của asparagin tấn công nhóm peptit liền kề, tạo ra sản phẩm trung gian succinimit đối xứng. Tính đối xứng của sản phẩm trung gian này dẫn đến hai sản phẩm thủy phân, aspartat hoặc isoaspartat. Phản ứng tương tự cũng có thể xảy ra trong chuỗi bên aspartat, làm chuyển hóa một phần thành isoaspartat. Trong

trường hợp glutamin, mức độ khử amit nhìn chung nhỏ hơn mười lần so với asparagin, tuy nhiên, cơ chế về cơ bản là giống nhau, chỉ cần phân tử nước để xúc tiến.

Thuật ngữ “đối tượng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ người hoặc động vật không phải người bất kỳ. Thuật ngữ “động vật không phải người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các động vật có xương sống, ví dụ động vật có vú và động vật không phải động vật có vú, như động vật linh trưởng không phải người, cừu, chó, mèo, bò, ngựa, gà, động vật lưỡng cư, và bò sát, mặc dù động vật có vú là được ưu tiên, như động vật linh trưởng không phải người, cừu, chó, mèo, bò và ngựa.

Các khía cạnh khác nhau của sáng chế được mô tả chi tiết hơn trong các phần sau.

Kháng thể kháng LAG-3 có độ ổn định tăng và các đặc tính chức năng có lợi

Các kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người và có độ ổn định được tối ưu hóa so với các kháng thể kháng LAG-3 được mô tả trước đây, cụ thể là so với kháng thể 25F7 (LAG3.1). Việc tối ưu hóa này bao gồm việc khử amit giảm (ví dụ, độ ổn định hóa học tăng) và tái gấp cuộn nhiệt tăng (ví dụ, độ ổn định vật lý tăng), trong khi vẫn duy trì được việc gắn kết ái lực cao với LAG-3 của người.

Các phương pháp nhận diện vị trí khử amit là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem sắc ký trao đổi ion, pha đảo, và tương tác kỵ nước, và lập bản đồ peptit của các phân cắt phân giải protein (LC-MS)). Các thử nghiệm thích hợp để đo độ ổn định vật lý bao gồm, ví dụ phân tích nhiệt độ nóng chảy và/hoặc việc tái gấp cuộn của cấu trúc kháng thể sau khi làm biến tính (ví dụ, tỷ lệ phần trăm thuận nghịch như được mô tả, ví dụ trong ví dụ 3, phần 3).

Việc gắn kết với LAG-3 của người có thể được đánh giá bằng một hoặc nhiều kỹ thuật cũng đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, kháng thể có thể được thử nghiệm bằng thử nghiệm miễn dịch dòng tế bào trong đó kháng thể này được cho phản ứng với dòng tế bào biểu hiện LAG-3 của người, như các tế bào CHO đã được chuyển nạp để biểu hiện LAG-3 (ví dụ, LAG-3 của người, hoặc LAG-3 của khỉ (ví dụ, khỉ nâu hoặc khỉ đuôi dài) hoặc LAG-3 của chuột) trên bề mặt tế bào của chúng. Các tế bào thích hợp khác để sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch dòng tế bào bao gồm tế bào T biểu hiện CD4 được hoạt hóa được kích thích bởi kháng CD3 biểu hiện LAG-3 nguyên thể. Ngoài ra, gắn kết của kháng thể này, bao gồm động học gắn kết (ví dụ, giá trị K_D), có thể được thử nghiệm

trong thử nghiệm BIAcore. Các thử nghiệm gắn kết thích hợp khác nữa bao gồm thử nghiệm ELISA, ví dụ bằng cách sử dụng protein LAG-3 tái tổ hợp.

Tốt hơn nếu các kháng thể theo sáng chế gắn kết với protein LAG-3 của người với hằng số K_D bằng 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa nếu bằng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn.

Thông thường, kháng thể này gắn kết với LAG-3 trong các mô bạch huyết, như amidan, lá lách hoặc tuyến ức, có thể được phát hiện bằng phương pháp hóa mô miễn dịch. Theo một phương án, kháng thể này nhuộm màu mô tuyến yên (ví dụ, được giữ trong tuyến yên) như được đo bằng phương pháp hóa mô miễn dịch. Theo một phương án khác, kháng thể này không nhuộm màu mô tuyến yên (tức là không được giữ trong tuyến yên) như được đo bằng phương pháp hóa mô miễn dịch.

Các đặc tính chức năng bổ sung bao gồm khả năng phản ứng chéo với LAG-3 từ loài khác. Ví dụ, kháng thể này có thể gắn kết với LAG-3 của khỉ (ví dụ, khỉ đuôi dài, khỉ nâu), nhưng gần như không gắn kết với LAG-3 từ chuột. Tốt hơn nếu, kháng thể theo sáng chế gắn kết với LAG-3 của người với ái lực cao.

Các đặc tính chức năng khác bao gồm khả năng của kháng thể kích thích đáp ứng miễn dịch, như đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Đặc tính này có thể được thử nghiệm, ví dụ bằng cách đánh giá khả năng của kháng thể kích thích sản sinh interleukin-2 trong đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Theo một số phương án, kháng thể này gắn kết với LAG-3 của người và kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Theo các phương án khác, kháng thể này gắn kết với LAG-3 của người nhưng không kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Các cách khác để đánh giá khả năng của kháng thể kích thích đáp ứng miễn dịch bao gồm kiểm tra khả năng của nó ức chế sự sinh trưởng khối u, như trong mô hình ghép khối u *in vivo* (ví dụ, xem ví dụ 6) hoặc khả năng kích thích đáp ứng tự miễn, như khả năng thúc đẩy sự phát triển của bệnh tự miễn trong mô hình bệnh tự miễn, ví dụ khả năng thúc đẩy sự phát triển của bệnh đái tháo đường trong mô hình NOD của chuột.

Các kháng thể được ưu tiên theo sáng chế là kháng thể đơn dòng của người. Ngoài ra, các kháng thể này có thể là, ví dụ kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc nhân tạo.

Kháng thể đơn dòng LAG3.5

Kháng thể được ưu tiên theo sáng chế là kháng thể đơn dòng của người, LAG3.5, được đặc trưng về mặt cấu trúc và hóa học như được mô tả dưới đây và trong phần ví dụ thực hiện sau. Trình tự axit amin của V_H của LAG3.5 được thể hiện trong SEQ ID NO.12 (Fig.2A). Trình tự axit amin của V_L của LAG3.5 được thể hiện trong SEQ ID NO.14 (Fig.2B).

Các trình tự V_H và V_L (hoặc các trình tự CDR) của các kháng thể kháng LAG-3 khác gắn kết với LAG-3 của người có thể “được trộn và làm tương thích” với các trình tự V_H và V_L (hoặc các trình tự CDR) của kháng thể LAG3.5. Tốt hơn nếu, khi các chuỗi V_H và V_L (hoặc các CDR trong các chuỗi này) được trộn và được làm tương thích, thì trình tự V_H từ tạo cặp V_H/V_L cụ thể được thay thế bằng trình tự V_H tương tự về mặt cấu trúc. Tương tự như vậy, tốt hơn nếu trình tự V_L từ tạo cặp V_H/V_L cụ thể được thay thế bằng trình tự V_L tương tự về mặt cấu trúc.

Do đó, theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.12 (tức là V_H của LAG3.5); và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.14 (tức là V_L của LAG3.5) hoặc V_L của một kháng thể kháng LAG3 khác (tức là kháng thể không phải là LAG3.5);

trong đó kháng thể này gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người.

Theo một phương án khác, các kháng thể theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm:

(a) vùng CDR1, vùng CDR2, và vùng CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.12 (tức là các trình tự CDR của LAG3.5, lần lượt các trình tự SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.16, và SEQ ID NO.17); và

(b) vùng CDR1, vùng CDR2, và vùng CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.14 (tức là các trình tự CDR của LAG3.5, lần lượt các trình tự SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.19, và SEQ ID NO.20) hoặc các CDR của một kháng thể kháng LAG3 khác (tức là kháng thể không phải là LAG3.5);

trong đó kháng thể này gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người.

Theo một phương án khác, kháng thể này, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 của LAG3.5 được kết hợp với các CDR của các kháng thể khác gắn kết với LAG-3 của người, ví dụ CDR1 và/hoặc CDR3 từ vùng biến đổi chuỗi nặng, và/hoặc CDR1, CDR2, và/hoặc CDR3 từ vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng LAG-3 khác.

Ngoài ra, trong lĩnh vực này đã biết rằng vùng CDR3, độc lập với (các) vùng CDR1 và/hoặc CDR2, riêng rẽ có thể xác định độ đặc hiệu gắn kết của kháng thể đối với kháng nguyên cùng họ và nhiều kháng thể có thể được tạo ra theo suy đoán có cùng độ đặc hiệu gắn kết dựa trên trình tự CDR3 thông thường. Ví dụ, xem Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995); Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996); Berezov *et al.*, *BIAjournal* 8:Scientific Review 8 (2001); Igarashi *et al.*, *J. Biochem (Tokyo)* 117:452-7 (1995); Bourgeois *et al.*, *J. Virol* 72:807-10 (1998); Levi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993); Polymenis and Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) và Xu and Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000). Cũng xem, patent Mỹ số 6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313; 6,827,925; 5,833,943; 5,762,905 và 5,760,185. Mỗi tài liệu này được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Do đó, theo một phương án khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng của LAG3.5 và ít nhất CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của LAG3.5 (các SEQ ID NO.17 và/hoặc 20), hoặc CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của một kháng thể LAG-3 khác, trong đó kháng thể này có khả năng gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người. Các kháng thể này tốt hơn nếu (a) cạnh tranh gắn kết với; (b) vẫn có các đặc điểm chức năng; (c) gắn kết với cùng epitop; và/hoặc (d) có ái lực gắn kết tương tự như LAG3.5. Theo một phương án khác, các kháng thể này còn có thể bao gồm CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của LAG3.5 (các SEQ ID NO.17 và/hoặc 20), hoặc CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của một kháng thể LAG-3 khác, trong đó kháng thể này có khả năng gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người. Theo một phương án khác, các kháng thể theo sáng chế còn có thể bao gồm CDR1

của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của LAG3.5 (các SEQ ID NO.17 và/hoặc 20), hoặc CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của một kháng thể LAG-3 khác, trong đó kháng thể này có khả năng gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người.

Các gốc cải biến bảo thủ

Theo một phương án khác, các kháng thể theo sáng chế chứa các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 không phải là các trình tự của LAG3.5 bằng một hoặc nhiều gốc cải biến bảo thủ. Tuy nhiên, theo một phương án ưu tiên, các gốc 54 và 56 của V_H CDR2 vẫn tương ứng là arginin và serin (tức là không được gây đột biến). Trong lĩnh vực này biết rằng một số biến đổi trình tự bảo thủ nhất định có thể được thực hiện mà không loại bỏ việc gắn kết kháng nguyên. Ví dụ, xem Brummell *et al.* (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt *et al.* (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870; Hall *et al.* (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy *et al.* (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 và Beers *et al.* (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43. Do đó, theo một phương án, kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3, trong đó:

(a) trình tự CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa SEQ ID NO.15, và/hoặc các gốc cải biến bảo thủ của nó, ngoại trừ ở các vị trí 54 và 56; và/hoặc

(b) trình tự CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa SEQ ID NO.17, và các gốc cải biến bảo thủ của nó; và/hoặc

(c) các trình tự CDR1, và/hoặc CDR2, và/hoặc CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO.18, và/hoặc, SEQ ID NO.19, và/hoặc SEQ ID NO.20, và/hoặc các gốc cải biến bảo thủ của chúng; và

(d) kháng thể gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người.

Ngoài ra, kháng thể này có thể có một hoặc nhiều đặc tính chức năng sau được mô tả trên đây, như gắn kết ái lực cao với LAG-3 của người, gắn kết với LAG-3 của khỉ, không gắn kết với LAG-3 của chuột, khả năng ức chế gắn kết của LAG-3 với các phân tử MHC nhóm II và/hoặc khả năng kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể này có thể là, ví dụ kháng thể của người, nhân tạo hoặc khảm.

Thuật ngữ “biến đổi trình tự bảo thủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cải biến axit amin không ảnh hưởng hoặc làm thay đổi đáng kể các đặc tính gắn kết của kháng thể chứa trình tự axit amin này. Các gốc cải biến bảo thủ như vậy bao gồm thay thế, thêm đoạn và mất đoạn axit amin. Các gốc cải biến có thể được đưa vào kháng thể theo sáng chế bằng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, như gây đột biến định hướng vị trí và gây đột biến qua trung gian PCR. Các thay thế axit amin bảo thủ là các thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương tự. Họ các gốc axit amin có chuỗi bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực này. Các họ này bao gồm các axit amin có chuỗi bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), chuỗi bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), chuỗi bên phân cực không tích điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein, tryptophan), chuỗi bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin), chuỗi bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và chuỗi bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Do đó, một hoặc nhiều gốc axit amin trong các vùng CDR của kháng thể theo sáng chế có thể được thay thế bằng các gốc axit amin khác từ cùng họ chuỗi bên và kháng thể được thay đổi có thể được thử nghiệm chức năng được giữ (*tức là* các chức năng đã nêu trên) bằng cách sử dụng các thử nghiệm chức năng được mô tả trong bản mô tả này.

Các kháng thể được thiết kế và cải biến

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách sử dụng kháng thể có một hoặc nhiều trình tự V_H và/hoặc V_L của LAG3.5 làm nguyên liệu ban đầu để xử lý kỹ thuật kháng thể được cải biến. Kháng thể có thể được thiết kế bằng cách cải biến một hoặc nhiều gốc trong một hoặc cả hai vùng biến đổi (*tức là* V_H và/hoặc V_L), ví dụ trong một hoặc nhiều vùng CDR và/hoặc trong một hoặc nhiều vùng khung. Ngoài ra, kháng thể có thể được thiết kế bằng cách cải biến các gốc trong (các) vùng hằng định, ví dụ để thay đổi (các) chức năng phản ứng lại kích thích của kháng thể này.

Theo một số phương án, việc ghép CDR có thể được sử dụng để xử lý kỹ thuật các vùng biến đổi của kháng thể. Các kháng thể tương tác với các kháng nguyên đích chủ yếu là qua các gốc axit amin nằm trong sáu vùng xác định bổ sung (complementarity

determining region - CDR) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vì lí do này, các trình tự axit amin trong CDR đa dạng hơn các trình tự bên ngoài CDR trong từng kháng thể. Do các trình tự CDR chịu trách nhiệm về hầu hết các tương tác kháng thể-kháng nguyên, nên có thể biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp bất chước các đặc tính của các kháng thể đặc hiệu có trong tự nhiên bằng cách xây dựng các vector biểu hiện chứa trình tự CDR từ kháng thể đặc hiệu có trong tự nhiên được ghép vào trình tự khung từ kháng thể khác có các đặc tính khác (ví dụ, xem Riechmann *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; patent Mỹ số 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370).

Do đó, theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 lần lượt chứa các trình tự SEQ ID NO.15, 16, 17, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 lần lượt chứa các trình tự SEQ ID NO.18, 19, 20 (tức là các CDR của LAG3.5). Trong khi các kháng thể này chứa các trình tự CDR của V_H và V_L của kháng thể đơn dòng LAG3.5, chúng có thể chứa các trình tự khung khác nhau.

Các trình tự khung này có thể thu được từ các cơ sở dữ liệu ADN công cộng hoặc các tài liệu được công bố bao gồm các trình tự gen của kháng thể dòng mầm. Ví dụ, trình tự ADN dòng mầm của các gen của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy tiêm bắp sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người "VBase" (có sẵn trên mạng Internet ở www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), cũng như trong Kabat *et al.* (1991), được trích dẫn *nêu trên*; Tomlinson *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; và Cox *et al.* (1994) "A Directory of Human Germline V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; nội dung của mỗi tài liệu này được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Một ví dụ khác, trình tự ADN dòng mầm của các gen của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy tiêm bắp sở dữ liệu của Ngân hàng gen. Ví dụ, các trình tự dòng mầm của chuỗi nặng sau được tìm thấy trong chuột HCo7 HuMAb là có sẵn trong ngân hàng gen với các số truy cập kèm theo: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 3-33 (NG_0010109 & NT_024637) và 3-7 (NG_0010109 & NT_024637).

Một ví dụ khác, các trình tự dòng mầm của chuỗi nặng sau được tìm thấy trong chuột HCo12 HuMAb là có sẵn trong ngân hàng gen với các số truy cập kèm theo: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 & BC070333), 5-51 (NG_0010109 & NT_024637), 4-34 (NG_0010109 & NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) & 3-23 (AJ406678).

Các trình tự protein của kháng thể được so sánh với cơ sở dữ liệu trình tự protein được biên soạn bằng cách sử dụng một trong số các phương pháp tìm kiếm mức độ tương đồng trình tự được gọi là Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997), nêu trên), đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các trình tự khung được ưu tiên để sử dụng trong các kháng thể theo sáng chế là các trình tự tương tự về mặt cấu trúc với các trình tự khung được sử dụng bởi kháng thể được chọn theo sáng chế, ví dụ tương tự với các trình tự khung V_H 4-34 và/hoặc các trình tự khung V_K L6 được sử dụng bởi kháng thể đơn dòng được ưu tiên theo sáng chế. Các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 của V_H, và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 của V_K, có thể được ghép trên vùng khung có trình tự giống như trình tự được tìm thấy trong gen globulin miễn dịch dòng mầm mà trình tự khung có nguồn gốc từ đó, hoặc các trình tự CDR có thể được ghép trên vùng khung chứa một hoặc nhiều đột biến so với các trình tự dòng mầm. Ví dụ, đã phát hiện ra rằng trong một số trường hợp sẽ có lợi nếu gây đột biến các gốc trong vùng khung để duy trì hoặc tăng cường khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể (ví dụ, xem Patent Mỹ số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370).

Một loại cải biến vùng biến đổi khác là gây đột biến các gốc axit amin trong các vùng CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 của V_H và/hoặc V_L, từ đó cải thiện một hoặc nhiều đặc tính gắn kết (ví dụ, ái lực) của kháng thể cần quan tâm. Việc gây đột biến định hướng vị trí hoặc gây đột biến qua trung gian PCR có thể được thực hiện để đưa (các) đột biến vào và tác dụng lên việc gắn kết của kháng thể, hoặc đặc tính chức năng cần quan tâm khác, có thể được đánh giá trong các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* như được mô tả trong sáng chế và được đưa ra trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Tốt hơn nếu các gốc cải biến bảo thủ (như đã mô tả trên đây) được đưa vào. Các đột biến này có thể là thay thế, thêm đoạn hoặc mất đoạn axit amin, nhưng tốt hơn nếu thay thế. Ngoài ra, thông thường không quá một, hai, ba, bốn hoặc năm gốc trong vùng CDR được thay đổi.

Do đó, theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng LAG-3 được phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi

chuỗi nặng chứa: (a) vùng V_H CDR1 chứa SEQ ID NO.15, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm thay thế, mất đoạn hoặc thêm đoạn axit amin so với SEQ ID NO.15; (b) vùng V_H CDR2 chứa SEQ ID NO.16, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm thay thế, mất đoạn hoặc thêm đoạn axit amin so với SEQ ID NO.16 (tốt hơn nếu trong đó các vị trí 54 và 56 là giống như trong SEQ ID NO.16); (c) vùng V_H CDR3 chứa SEQ ID NO.17, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm thay thế, mất đoạn hoặc thêm đoạn axit amin so với SEQ ID NO.17; (d) vùng V_L CDR1 chứa SEQ ID NO.18, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm thay thế, mất đoạn hoặc thêm đoạn axit amin so với SEQ ID NO.18; (e) vùng V_L CDR2 chứa SEQ ID NO.19, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm thay thế, mất đoạn hoặc thêm đoạn axit amin so với SEQ ID NO.19; và (f) vùng V_L CDR3 chứa SEQ ID NO.20, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm thay thế, mất đoạn hoặc thêm đoạn axit amin so với SEQ ID NO.20.

Các kháng thể được thiết kế theo sáng chế bao gồm các kháng thể trong đó các cải biến được thực hiện đối với các gốc khung trong V_H và/hoặc V_L , ví dụ để cải thiện các đặc tính của kháng thể. Thông thường, các cải biến ở khung này được thực hiện để làm giảm khả năng sinh miễn dịch của kháng thể. Ví dụ, một phương pháp là gây “đột biến ngược” một hoặc nhiều gốc khung thành trình tự dòng mầm tương ứng. Cụ thể hơn, kháng thể đã trải qua sự đột biến sinh dưỡng có thể chứa gốc khung khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ đó. Các gốc này có thể được nhận diện bằng cách so sánh trình tự khung của kháng thể với trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ đó.

Một loại cải biến khung khác bao gồm gây đột biến một hoặc nhiều gốc trong vùng khung, hoặc thậm chí trong một hoặc nhiều vùng CDR, để loại bỏ epitop của tế bào T từ đó làm giảm khả năng sinh miễn dịch tiềm tàng của kháng thể. Phương pháp này còn được gọi là “khử miễn dịch” (deimmunization) và được mô tả chi tiết hơn trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số công bố 20030153043.

Ngoài các cải biến hoặc các cải biến thay thế được thực hiện trong vùng khung hoặc CDR, các kháng thể theo sáng chế có thể được thiết kế để chứa các cải biến trong vùng Fc, thông thường để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể, như thời gian bán thải trong huyết thanh, cố định bổ thể, gắn kết với thụ thể Fc, và/hoặc tính

độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể được biến đổi hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn kết với kháng thể này) hoặc được cải biến để thay đổi quá trình glycosyl hóa của nó, cũng để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể. Mỗi trong số các phương án này được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Việc đánh số các gốc trong vùng Fc là đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

Theo một phương án ưu tiên, kháng thể này là kháng thể isotyp IgG4 chứa đột biến serin thành prolin ở vị trí tương ứng với vị trí 228 (S228P; chỉ số EU) trong vùng bản lề của vùng hằng định chuỗi nặng. Đột biến này đã được báo cáo là làm mất tính không đồng nhất của cầu liên kết disulfua liên chuỗi nặng trong vùng bản lề (Angal *et al.*, *nêu trên*; vị trí 241 là tính theo hệ đánh số Kabat).

Theo một phương án, vùng bản lề của CH1 được cải biến sao cho số lượng gốc xystein trong vùng bản lề này được thay đổi, ví dụ tăng hoặc giảm. Phương pháp này được mô tả thêm trong patent Mỹ số 5,677,425. Số lượng gốc xystein trong vùng bản lề của CH1 được thay đổi để, ví dụ tạo thuận lợi cho việc lắp ráp các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc để làm tăng hoặc giảm độ ổn định của kháng thể.

Theo một phương án khác, vùng bản lề Fc của kháng thể được gây đột biến để làm giảm thời gian bán thải sinh học của kháng thể. Cụ thể hơn, một hoặc nhiều đột biến axit amin được đưa vào vùng liên bề mặt của miền CH2-CH3 của mảnh bản lề Fc sao cho kháng thể này có gắn kết với *Staphylococcyll* protein A (SpA) giảm so với gắn kết với SpA có miền bản lề Fc nguyên thể. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong patent Mỹ số 6,165,745.

Theo một phương án khác, kháng thể này được cải biến để làm tăng thời gian bán thải sinh học của nó. Các phương pháp khác cũng có thể áp dụng. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến sau có thể được đưa vào: T252L, T254S, T256F, như được mô tả trong patent Mỹ số 6,277,375. Theo cách khác, để làm tăng thời gian bán thải sinh học, kháng thể này có thể được thay đổi trong vùng CH1 hoặc CL để chứa thụ thể cứu gắn kết epitop được lấy từ hai vòng lặp của miền CH2 của vùng Fc của IgG, như được mô tả trong patent Mỹ số 5,869,046 và 6,121,022.

Theo các phương án khác, vùng Fc được thay đổi bằng cách thay thế ít nhất một gốc axit amin bằng gốc axit amin khác để thay đổi (các) chức năng phản ứng lại kích

thích của kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 và 322 có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể này có ái lực đối với phối tử phản ứng lại kích thích thay đổi nhưng vẫn vẫn có khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể gốc. Phối tử phản ứng lại kích thích mà ái lực được thay đổi có thể là, ví dụ thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của bổ thể. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong patent Mỹ số 5,624,821 và 5,648,260.

Theo một ví dụ khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 329, 331 và 322 có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể này có gắn kết với C1q thay đổi và/hoặc tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC) giảm hoặc mất. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong patent Mỹ số 6,194,551.

Theo một ví dụ khác, một hoặc nhiều gốc axit amin trong các vị trí axit amin 231 và 239 được thay đổi để từ đó thay đổi khả năng cố định bổ thể của kháng thể. Phương pháp này được mô tả thêm trong WO 94/29351.

Theo một phương án khác, vùng Fc được cải biến để làm tăng khả năng làm trung gian tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC) của kháng thể và/hoặc làm tăng ái lực của kháng thể đối với thụ thể Fcγ bằng cách cải biến một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí sau: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439. Phương pháp này được mô tả thêm trong WO00/42072. Ngoài ra, các vị trí gắn kết trên IgG1 của người đối với FcγR1, FcγR2, FcγR3 và FcRn đã được lập bản đồ và các biến thể có gắn kết được cải thiện đã được mô tả (xem Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Các đột biến cụ thể ở các vị trí 256, 290, 298, 333, 334 và 339 đã thể hiện là cải thiện gắn kết với FcγR3. Ngoài ra, các thể đột biến kết hợp sau đã thể hiện là cải thiện gắn kết với FcγR3: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A và S298A/E333A/K334A.

Theo một phương án khác, việc glycosyl hóa kháng thể được cải biến. Ví dụ, kháng thể không glycosyl hóa có thể được tạo ra (*tức là* kháng thể này không có quá trình glycosyl hóa). Việc glycosyl hóa có thể được thay đổi để, ví dụ làm tăng ái lực của kháng

thể với kháng nguyên. Các cải biến hydrat cacbon như vậy có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ thay đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong trình tự của kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều thay thế axit amin có thể được thực hiện dẫn đến loại bỏ một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa của khung vùng biến đổi từ đó làm mất quá trình glycosyl hóa ở vị trí đó. Việc không glycosyl hóa như vậy có thể làm tăng ái lực của kháng thể với kháng nguyên. Ví dụ, xem patent Mỹ số 5,714,350 và 6,350,861.

Ngoài ra, kháng thể có thể được tạo ra sao cho có kiểu glycosyl hóa thay đổi, như kháng thể giảm fucosyl hóa có số lượng các gốc fucosyl được giảm hoặc kháng thể có cấu trúc GlcNac tách đôi tăng. Các kiểu glycosyl hóa thay đổi như vậy đã được chứng minh là làm tăng hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể của kháng thể. Các cải biến hydrat cacbon như vậy có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ biểu hiện kháng thể trong tế bào vật chủ có cơ chế glycosyl hóa thay đổi. Các tế bào có cơ chế glycosyl hóa thay đổi đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật và có thể được sử dụng làm tế bào vật chủ trong đó để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế, từ đó để sản xuất kháng thể có sự glycosyl hóa thay đổi. Ví dụ, các dòng tế bào Ms704, Ms705, và Ms709 thiếu gen fucosyltransferaza, FUT8 (α (1,6)-fucosyltransferaza), vì vậy các kháng thể được biểu diễn trong các dòng tế bào Ms704, Ms705, và Ms709 thiếu fucoza trên các hydrat cacbon của chúng. Các dòng tế bào FUT8^{-/-} Ms704, Ms705, và Ms709 được tạo ra bằng cách phá vỡ đích gen FUT8 trong tế bào CHO/DG44 bằng cách sử dụng hai vectơ thay thế (xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20040110704 và Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Một ví dụ khác, EP 1,176,195 mô tả dòng tế bào có gen FUT8 được phá vỡ về mặt chức năng, mã hóa fucosyl transferaza, vì vậy các kháng thể được biểu hiện trong dòng tế bào này có sự giảm fucosyl hóa bằng cách làm giảm hoặc làm mất enzym liên quan đến liên kết α -1,6. EP 1,176,195 cũng mô tả các dòng tế bào có hoạt tính enzym thấp để bổ sung fucoza vào N-axetylglucosamin gắn kết với vùng Fc của kháng thể hoặc không có hoạt tính enzym, ví dụ dòng tế bào u tủy của chuột cống YB2/0 (ATCC CRL 1662). WO03/035835 mô tả dòng tế bào CHO biến thể, các tế bào Lec13, có khả năng gắn fucoza vào các hydrat cacbon được liên kết Asn(297) giảm, cũng dẫn đến giảm fucosyl hóa kháng thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ đó (cũng xem Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Các kháng thể có profin glycosyl hóa được cải biến cũng có thể được sản xuất trong trứng gà, như được mô tả trong WO06/089231. Theo cách khác, các kháng thể có profin glycosyl hóa được

cải biến có thể được sản xuất trong các tế bào thực vật, như *Lemna*. Các phương pháp sản xuất kháng thể trong hệ thống thực vật được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ của đại diện Alston & Bird LLP số hồ sơ 040989/314911, được nộp ngày 11 tháng 8 năm 2006. WO 99/54342 mô tả các dòng tế bào được thiết kế để biểu hiện glycosyl transferaza cải biến glycoprotein (ví dụ, $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) vì vậy các kháng thể được biểu hiện trong các dòng tế bào được thiết kế này có cấu trúc GlcNac tách đôi tăng dẫn đến tăng hoạt tính ADCC của kháng thể (cũng xem Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Theo cách khác, các gốc fucoza của kháng thể có thể được phân cắt bằng cách sử dụng enzym fucosidaza; ví dụ, fucosidaza α -L-fucosidaza loại bỏ các gốc fucosyl khỏi kháng thể (Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Sáng chế đề cập đến một cải biến khác của kháng thể trong bản mô tả này là sự PEG hóa. Kháng thể có thể được PEG hóa để, ví dụ làm tăng thời gian bán thải sinh học (ví dụ, huyết thanh) của kháng thể. Để PEG hóa kháng thể, kháng thể này, hoặc mảnh của nó, thường được cho phản ứng với polyetylen glycol (PEG), như este phản ứng hoặc dẫn xuất aldehyt của PEG, trong các điều kiện trong đó một hoặc nhiều nhóm PEG được gắn kết với kháng thể hoặc mảnh kháng thể này. Tốt hơn nếu, sự PEG hóa được thực hiện thông qua phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với phân tử PEG phản ứng (hoặc polyme tan trong nước phản ứng tương tự). Thuật ngữ “polyetylen glycol” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng bất kỳ trong số các dạng của PEG đã được sử dụng để tạo dẫn xuất các protein khác, như mono (C1-C10) alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol-maleimit. Theo một số phương án, kháng thể được PEG hóa này là kháng thể không glycosyl hóa. Các phương pháp PEG hóa protein là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được áp dụng cho các kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, xem EP 0 154 316 và EP 0 401 384.

Các đặc tính vật lý của kháng thể

Các kháng thể theo sáng chế có thể được đặc trưng bởi các đặc tính vật lý khác nhau của chúng, để phát hiện và/hoặc phân biệt với các nhóm khác của chúng.

Ví dụ, các kháng thể có thể chứa một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng. Các vị trí glycosyl hóa này có thể dẫn đến làm tăng khả năng sinh miễn dịch của kháng thể hoặc thay đổi pK của kháng thể do thay đổi việc

gắn kết kháng nguyên (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Việc glycosyl hóa đã biết là xảy ra ở các cấu trúc chứa trình tự N-X-S/T. Trong một số trường hợp, ưu tiên có kháng thể kháng LAG-3 không có sự glycosyl hóa vùng biến đổi. Điều này có thể đạt được bằng cách lựa chọn các kháng thể không chứa cấu trúc glycosyl hóa trong vùng biến đổi hoặc bằng cách gây đột biến các gốc trong vùng glycosyl hóa.

Theo một phương án ưu tiên, các kháng thể này không chứa vị trí đồng phân asparagin. Việc khử amit của asparagin có thể xảy ra trên trình tự N-G hoặc D-G và dẫn đến tạo ra gốc axit isoaspartic đưa nút xoắn vào chuỗi polypeptit và làm giảm độ ổn định của nó (tác dụng axit isoaspartic).

Mỗi kháng thể sẽ có duy nhất một điểm đẳng điện (pI), điểm này thường nằm ở khoảng độ pH từ 6 đến 9,5. pI của kháng thể IgG1 thường nằm trong khoảng độ pH từ 7-9,5 và pI của kháng thể IgG4 thường nằm trong khoảng độ pH từ 6-8. Có suy đoán rằng các kháng thể có pI nằm ngoài khoảng bình thường có thể có một số không gấp cuộn và không ổn định trong các điều kiện *in vivo*. Do đó, ưu tiên có kháng thể kháng LAG-3 có giá trị pI nằm trong khoảng bình thường. Điều này có thể đạt được bằng cách lựa chọn các kháng thể có pI trong khoảng bình thường hoặc bằng cách gây đột biến các gốc bề mặt được tích điện.

Axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, hoặc các CDR, của kháng thể theo sáng chế. Các axit nucleic này có thể có mặt trong tế bào nguyên vẹn, trong dịch tan tế bào, hoặc trong dạng được tinh chế một phần hoặc gần như tinh khiết. Axit nucleic là “được phân lập” hoặc “được làm gần như tinh khiết” khi được tinh chế khỏi các thành phần tế bào khác hoặc các tạp chất khác, ví dụ các axit nucleic hoặc protein khác của tế bào, bằng các kỹ thuật chuẩn, bao gồm xử lý kiềm/SDS, tạo dải CsCl, sắc ký cột, điện di trên gel agarosa và các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực này. Xem, Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.

Axit nucleic theo sáng chế có thể là, ví dụ ADN hoặc ARN và có hoặc không chứa các trình tự intron. Theo một phương án ưu tiên, axit nucleic này là phân tử ADN bổ trợ.

Các axit nucleic theo sáng chế có thể thu được bằng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. Đối với các kháng thể được biểu hiện bởi các tế bào lai (ví dụ, các tế bào lai được tạo ra từ chuột chuyển gen mang gen globulin miễn dịch của người như được mô tả thêm dưới đây), thì các ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai này có thể thu được bằng kỹ thuật khuếch đại PCR hoặc tách dòng ADN bổ trợ chuẩn. Đối với các kháng thể thu được từ thư viện gen globulin miễn dịch (ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể), thì axit nucleic mã hóa các kháng thể này có thể được khôi phục từ thư viện gen này.

Các axit nucleic được ưu tiên theo sáng chế bao gồm các phân tử mã hóa các trình tự V_H và V_L của kháng thể đơn dòng LAG3.5 (lần lượt SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.14) hoặc các CDR. Khi các đoạn ADN mã hóa các đoạn V_H và V_L thu được, thì các đoạn ADN này có thể được thao tác tiếp bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp chuẩn, ví dụ để chuyển các gen vùng biến đổi sang các gen của chuỗi kháng thể có chiều dài đầy đủ, sang các gen của mảnh Fab hoặc gen scFv. Trong các thao tác này, mảnh ADN mã hóa V_L hoặc V_H được liên kết hoạt động với một mảnh ADN khác mã hóa một protein khác, như vùng hằng định của kháng thể hoặc cầu liên kết linh hoạt. Thuật ngữ “được liên kết hoạt động”, được sử dụng trong trường hợp này, được dự định có nghĩa là hai đoạn ADN được nối sao cho các trình tự axit amin được mã hóa bởi hai đoạn ADN này vẫn ở trong khung.

ADN được phân lập mã hóa vùng V_H có thể được chuyển sang gen của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bằng cách liên kết hoạt động ADN mã hóa V_H với một phân tử ADN khác mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng (CH1, CH2 và CH3). Các trình tự gen của vùng hằng định chuỗi nặng của người là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem Kabat *et al.* (1991), nêu trên) và các đoạn ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR chuẩn. Vùng hằng định chuỗi nặng có thể là vùng hằng định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM hoặc IgD, nhưng tốt nhất nếu vùng hằng định của IgG1 hoặc IgG4. Đối với gen của chuỗi nặng của mảnh Fab, ADN mã hóa V_H có thể được liên kết hoạt động với một phân tử ADN khác chỉ mã hóa vùng hằng định CH1 của chuỗi nặng.

ADN được phân lập mã hóa vùng V_L có thể được chuyển sang gen của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ (cũng như gen của chuỗi nhẹ Fab) bằng cách liên kết hoạt động ADN mã hóa V_L với một phân tử ADN khác mã hóa vùng hằng định của chuỗi nhẹ, CL. Các trình tự gen của vùng hằng định chuỗi nhẹ của người là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem Kabat *et al.*, nêu trên) và các đoạn ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR chuẩn. Theo các phương án ưu tiên, vùng hằng định của chuỗi nhẹ có thể là vùng hằng định kappa hoặc lamda.

Để tạo ra gen scFv, các đoạn ADN mã hóa V_H và V_L được liên kết hoạt động với một mảnh khác mã hóa cầu liên kết linh hoạt, ví dụ mã hóa trình tự axit amin (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO.28), sao cho các trình tự V_H và V_L có thể được biểu hiện dưới dạng protein chuỗi đơn liên kết, với các vùng V_L và V_H được nối bằng cầu liên kết linh hoạt (ví dụ, xem, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Sản xuất kháng thể đơn dòng theo sáng chế

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp sản xuất thể lai tế bào sinh dưỡng (tế bào lai) đã biết của Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Các phương pháp khác để sản xuất kháng thể đơn dòng bao gồm các phương pháp biến nạp virus hoặc gen sinh ung thư của tế bào lympho B và biểu hiện thực khuẩn thể. Kháng thể thể khảm hoặc nhân tạo cũng đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem Patent Mỹ số 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án ưu tiên, các kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng của người. Các kháng thể đơn dòng của người này nhằm chống lại LAG-3 của người có thể được sản xuất bằng chuột chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể mang các phần của hệ miễn dịch của người chứ không mang hệ miễn dịch của chuột. Chuột chuyển gen và chuyển nhiễm sắc thể này bao gồm chuột được gọi trong bản mô tả này tương ứng là HuMAb Mouse[®] và KM Mouse[®], và được gọi chung trong bản mô tả này là “chuột Ig của người”.

HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) chứa cụm nhỏ gen globulin miễn dịch của người mã hóa trình tự globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ κ và chuỗi nặng (μ và γ) của người không được sắp xếp lại, cùng với các đột biến đích làm bất hoạt các cụm chuỗi μ

và κ nội sinh (ví dụ, xem Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Do đó, chuột có biểu hiện IgM hoặc κ của chuột, và đáp ứng với việc gây miễn dịch giảm, các gen chuyển của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được đưa vào trải qua quá trình chuyển nhóm và đột biến sinh dưỡng để tạo ra kháng thể đơn dòng IgG κ của người có ái lực cao (Lonberg *et al.* (1994), nêu trên; được xem xét trong Lonberg (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, và Harding and Lonberg (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Việc tạo và sử dụng HuMAb Mouse[®], và các cải biến hệ gen được mang bởi chuột này, được mô tả thêm trong Taylor *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; và Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, nội dung của toàn bộ trong số các tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn toàn bộ. Xem thêm, patent Mỹ số 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,770,429; và 5,545,807; WO92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 and WO01/14424, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một phương án khác, kháng thể của người theo sáng chế có thể được tăng lên bằng cách sử dụng chuột mang trình tự globulin miễn dịch của người trên gen chuyển và nhiễm sắc thể chuyển, như chuột mang gen chuyển của chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nhẹ của người. Chuột này được gọi trong bản mô tả này là “KM mouse[®]”, và được mô tả chi tiết trong WO02/43478. Dạng được cải biến của chuột này, còn bao gồm sự phá vỡ đồng hợp tử của gen thụ thể Fc γ RIIB nội sinh, cũng được mô tả trong WO02/43478 và được gọi trong bản mô tả này là “KM/FCGR2D mouse[®]”. Ngoài ra, chuột có mỗi một trong số các gen chuyển của chuỗi nặng HCo7 hoặc HCo12 hoặc cả hai có thể được sử dụng.

Các phương án về động vật chuyển gen bổ sung bao gồm Xenomouse (Abgenix, Inc., patent Mỹ số 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 và 6,162,963). Các phương án thực hiện khác bao gồm “chuột TC” (Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 97:722-727) và bào mang nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894; WO02/092812). Nội dung của các patent và công bố đơn này được hợp nhất cụ thể vào tài liệu này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một phương án, các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể để sàng lọc thư viện của các gen globulin miễn dịch của người. Ví dụ, xem. patent Mỹ số 5,223,409; 5,403,484; 5,571,698; 5,427,908; 5,580,717; 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; và 6,593,081, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng chuột SCID trong đó các tế bào miễn dịch của người được hoàn nguyên sao cho đáp ứng kháng thể của người có thể được tạo ra khi gây miễn dịch. Ví dụ, xem patent Mỹ số 5,476,996 và 5,698,767, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một phương án khác, các kháng thể kháng LAG-3 của người được tạo ra bằng cách biểu hiện thực khuẩn thể trong đó các thực khuẩn thể chứa các axit nucleic mã hóa kháng thể được tạo ra trong động vật chuyển gen đã được gây miễn dịch trước bằng LAG-3. Theo một phương án ưu tiên, động vật chuyển gen này là chuột HuMab, KM, hoặc Kirin. Ví dụ, xem patent Mỹ số 6,794,132, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Gây miễn dịch chuột Ig của người

Theo một phương án thực hiện của sáng chế, chuột Ig của người được gây miễn dịch bằng chế phẩm kháng nguyên LAG-3 được tinh chế hoặc được làm giàu, protein LAG-3 tái tổ hợp, hoặc các tế bào biểu hiện protein LAG-3. Ví dụ, xem Lonberg *et al.* (1994), nêu trên; Fishwild *et al.* (1996), nêu trên; WO 98/24884 hoặc WO01/14424, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo một phương án ưu tiên, chuột 6-16 tuần tuổi được gây miễn dịch bằng 5-50 μ g protein LAG-3. Theo cách khác, một phần của LAG-3 được dung hợp với polypeptit không phải LAG-3 được sử dụng.

Theo một phương án, chuột chuyển gen này được gây miễn dịch tiêm màng bụng (intraperitoneally - IP) hoặc tiêm tĩnh mạch (đường tiêm tĩnh mạchly - IV) bằng kháng

nguyên LAG-3 trong tá chất Freund hoàn chỉnh, tiếp theo gây miễn dịch IP hoặc IV tiếp bằng kháng nguyên trong tá chất Freund không hoàn chỉnh. Theo các phương án khác, các tá chất không phải là tá chất Freund hoặc tế bào nguyên vẹn không có tá chất được sử dụng. Huyết tương có thể được sàng lọc bằng ELISA và các tế bào từ chuột có đủ hiệu giá globulin miễn dịch của người kháng LAG-3 có thể được sử dụng để dung hợp.

Sản xuất tế bào lai sản sinh kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế

Để sản xuất tế bào lai sản sinh kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế, các tế bào lách và/hoặc tế bào hạch bạch huyết từ chuột được gây miễn dịch có thể được phân lập và được dung hợp với dòng tế bào được làm bất tử thích hợp, như dòng tế bào u tủy của chuột. Tế bào lai thu được có thể được sàng lọc về việc sản sinh kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Việc sản xuất tế bào lai là đã được biết trong lĩnh vực này. Xem, 0, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York.

Sản xuất tế bào chuyển nạp sản sinh kháng thể đơn dòng theo sáng chế

Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra trong tế bào chuyển nạp của tế bào vật chủ bằng cách sử dụng, ví dụ kết hợp kỹ thuật ADN tái tổ hợp và phương pháp chuyển nạp gen như đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). Theo một phương án, ADN mã hóa các chuỗi nhẹ và nặng có chiều dài một phân hoặc đầy đủ thu được bằng kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn được cài xen vào một hoặc nhiều vector biểu hiện sao cho các gen được liên kết hoạt động với các trình tự điều hòa phiên mã và dịch mã. Trong trường hợp này, thuật ngữ “được liên kết hoạt động” được dự định có nghĩa là gen của kháng thể được cài vào vector sao cho trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã trong vector này phát huy chức năng dự định của chúng là điều hòa sự phiên mã và dịch mã của gen của kháng thể.

Thuật ngữ “trình tự điều hòa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự khởi động, trình tự tăng cường và các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện khác (ví dụ, tín hiệu polyadenyl hóa) kiểm soát sự phiên mã hoặc dịch mã của các gen của chuỗi kháng thể. Các trình tự điều hòa như vậy được mô tả trong, ví dụ Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Các trình tự điều hòa được ưu tiên đối với sự biểu hiện ở tế bào vật chủ động vật có vú bao gồm các yếu tố thuộc virus nhằm trực tiếp mức độ biểu hiện protein cao ở tế bào động vật

có vú, như trình tự khởi động và/hoặc trình tự tăng cường có nguồn gốc từ cytomegalovirut (CMV), virut ở khỉ 40 (Simian Virus 40 - SV40), adenovirut, (ví dụ, trình tự khởi động muộn chính ở adenovirut (adenovirus major late promoter - AdMLP) và virut polioma. Theo cách khác, các trình tự điều hòa không thuộc virut có thể được sử dụng, như trình tự khởi động ubiquitin hoặc trình tự khởi động β -globin. Ngoài ra, các yếu tố điều hòa bao gồm các trình tự từ các nguồn khác nhau, như hệ thống trình tự khởi động SR α , chứa các trình tự từ trình tự khởi động sớm SV40 và trình tự lặp đầu tận cùng dài của virut gây bệnh bạch cầu tế bào T của người loại 1 (Takebe *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472). Vector biểu hiện và trình tự kiểm soát sự biểu hiện được chọn để tương thích với tế bào vật chủ biểu hiện được sử dụng.

Gen của chuỗi nhẹ của kháng thể và gen của chuỗi nặng của kháng thể có thể được cài xen vào cùng hoặc riêng vector biểu hiện. Theo các phương án ưu tiên, vùng biến đổi được sử dụng để tạo ra gen của kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc isotyp kháng thể bất kỳ bằng cách cài xen chúng vào các vector biểu hiện mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng và vùng hằng định của chuỗi nhẹ của isotyp mong muốn sao cho đoạn V_H được liên kết hoạt động với (các) đoạn C_H trong vector này và đoạn V_L được liên kết hoạt động với đoạn C_L trong vector này. Ngoài ra, vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mã hóa peptit tín hiệu tạo thuận lợi cho việc bài tiết chuỗi kháng thể khỏi tế bào vật chủ. Gen của chuỗi kháng thể này có thể được phân tách dòng vào vector sao cho peptit tín hiệu được liên kết trong khung với đầu tận cùng amino của gen của chuỗi kháng thể. Peptit tín hiệu này có thể là peptit tín hiệu globulin miễn dịch hoặc peptit tín hiệu khác loại (*tức là* peptit tín hiệu từ protein không phải globulin miễn dịch).

Ngoài gen của chuỗi kháng thể và các trình tự điều hòa, các vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế có thể mang các trình tự bổ sung, như các trình tự điều hòa sự sao chép của vector trong tế bào vật chủ (ví dụ, trình tự khởi đầu sao chép) và các gen đánh dấu dễ chọn lọc. Gen đánh dấu dễ chọn lọc tạo thuận lợi cho việc chọn lọc tế bào vật chủ mà vector được đưa vào (ví dụ, xem patent Mỹ số 4,399,216; 4,634,665 và 5,179,017). Ví dụ, thông thường gen đánh dấu dễ chọn lọc truyền tính kháng các thuốc, như G418, hygromycin hoặc metotrexat, trên tế bào vật chủ mà vector đã được đưa vào. Các gen đánh dấu dễ chọn lọc được ưu tiên bao gồm gen dihydrofolat reductaza (dihydrofolate

reductase - DHFR) (để sử dụng trong tế bào vật chủ dhfr đối với việc chọn lọc/khuếch đại metotrexat) và gen neo (đối với việc chọn lọc G418).

Để biểu hiện các chuỗi nhẹ và nặng, (các) vector biểu hiện mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chuyển nạp vào tế bào vật chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Các dạng khác nhau của thuật ngữ “chuyển nạp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nhiều kỹ thuật thường được sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào tế bào vật chủ của sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật có nhân điển hình, ví dụ điện di, kết tủa canxi-phosphat, chuyển nạp DEAE-dextran và các kỹ thuật tương tự. Mặc dù, về mặt lý thuyết có thể biểu hiện các kháng thể theo sáng chế trong tế bào vật chủ của sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật có nhân điển hình, nhưng sự biểu hiện của kháng thể trong các tế bào của sinh vật có nhân điển hình, và tốt nhất nếu tế bào vật chủ của động vật có vú, là được ưu tiên nhất do các tế bào của sinh vật có nhân điển hình, và đặc biệt là các tế bào của động vật có vú, là thích hợp hơn so với các tế bào của sinh vật chưa có nhân điển hình để lắp ráp và tiết kháng thể được gấp cuộn chính xác và có hoạt tính miễn dịch.

Tế bào vật chủ của động vật có vú được ưu tiên để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO) (bao gồm tế bào dhfr⁻ CHO, được mô tả trong Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, được sử dụng với gen đánh dấu để chọn lọc DHFR, ví dụ như được mô tả trong R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), tế bào u tủy NSO, tế bào COS và tế bào SP2. Đặc biệt là, để sử dụng với tế bào u tủy NSO, một hệ biểu hiện được ưu tiên khác là hệ biểu hiện gen GS được bộc lộ trong WO 87/04462, WO 89/01036 và EP 338,841. Khi các vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa các gen của kháng thể được đưa vào tế bào vật chủ của động vật có vú, các kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ trong một khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong tế bào vật chủ này hoặc, tốt hơn nữa, bài tiết kháng thể vào môi trường nuôi cấy mà tế bào vật chủ được phát triển. Các kháng thể có thể được thu lại từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp tinh chế protein chuẩn.

Thể tiếp hợp miễn dịch

Các kháng thể theo sáng chế có thể được tiếp hợp với dược chất để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch như thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (antibody-drug conjugate - ADC).

Các dược chất thích hợp bao gồm chất chống chuyển hóa, tác nhân alkyl hóa, chất gắn kết rãnh ADN nhỏ, chất xen giữa ADN, chất liên kết chéo ADN, chất ức chế histon deacetylaza, chất ức chế bài xuất nhân, chất ức chế proteasom, chất ức chế topoisomeraza I hoặc II, chất ức chế protein sốc nhiệt, chất ức chế tyrosin kinaza, kháng sinh, và chất chống nguyên phân. Trong ADC, kháng thể và dược chất tốt hơn nếu được tiếp hợp thông qua cầu liên kết dễ phân cắt như cầu liên kết peptidyl, disulfua, hoặc hydrazon. Tốt hơn nữa nếu, cầu liên kết này là cầu liên kết peptidyl như Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO.39), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser, hoặc Glu. Các ADC có thể được tạo ra như được mô tả trong Patent Mỹ số 7,087,600; 6,989,452; và 7,129,261; WO02/096910; WO07/038658; WO07/051081; WO07/059404; WO08/083312; và WO08/103693; công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20060024317; 20060004081; và 20060247295; được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Phân tử đặc hiệu kép

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử đặc hiệu kép chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế được liên kết với ít nhất một phân tử chức năng khác, ví dụ một peptit hoặc protein khác (ví dụ, một kháng thể khác hoặc phối tử của thụ thể) để tạo ra phân tử đặc hiệu kép gắn kết với ít nhất hai vị trí gắn kết hoặc phân tử đích khác nhau. Do đó, khi được sử dụng trong bản mô tả, “phân tử đặc hiệu kép” bao gồm các phân tử có ba hoặc nhiều tính đặc hiệu. Theo một phương án ưu tiên, phân tử đặc hiệu kép bao gồm độ đặc hiệu gắn kết thứ nhất đối với LAG-3 và độ đặc hiệu gắn kết thứ hai đối với phân tử kích hoạt tuyển chọn các tế bào hiệu ứng gây độc tế bào có thể làm chết tế bào đích biểu hiện LAG-3. Ví dụ về các phân tử kích hoạt thích hợp là CD64, CD89, CD16, và CD3. Ví dụ, xem Kufer *et al.*, *TRENDS in Biotechnology*, 22 (5), 238-244 (2004).

Theo một phương án, phân tử đặc hiệu kép có, ngoài độ đặc hiệu gắn kết kháng Fc và độ đặc hiệu gắn kết kháng LAG-3, tính đặc hiệu thứ ba. Tính đặc hiệu thứ ba có thể là đối với yếu tố kháng tăng cường (enhancement factor - EF), ví dụ phân tử gắn kết với protein bề mặt liên quan đến hoạt tính gây độc tế bào và từ đó làm tăng đáp ứng miễn dịch chống tế bào đích. Ví dụ, yếu tố kháng tăng cường có thể gắn kết với tế bào T độc tế

bào (ví dụ, thông qua CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, hoặc ICAM-1) hoặc tế bào miễn dịch khác, dẫn đến làm tăng đáp ứng miễn dịch chống tế bào đích.

Các phân tử đặc hiệu kép có thể có nhiều dạng và kích thước khác nhau. Ở một đầu của phổ kích thước, phân tử đặc hiệu kép vẫn có dạng của kháng thể truyền thống, ngoại trừ, thay vì có hai nhánh gắn kết có tính đặc hiệu giống nhau, nó có hai nhánh gắn kết, mỗi nhánh có tính đặc hiệu khác nhau. Ở đầu kia là các phân tử đặc hiệu kép bao gồm hai mảnh kháng thể chuỗi đơn (scFv's) được liên kết bởi chuỗi peptit, được gọi là cấu trúc Bs(scFv)₂. Phân tử đặc hiệu kép có kích thước trung gian bao gồm hai mảnh F(ab) khác nhau được liên kết bởi cầu liên kết peptidyl. Các phân tử đặc hiệu kép có dạng này và các dạng khác có thể được sản xuất bằng cách kỹ thuật di truyền, tạo thể lai sinh dưỡng, hoặc các phương pháp hóa học. Ví dụ, xem Kufer *et al.*, được trích dẫn *trên đây*; Cao and Suresh, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (6), 635-644 (1998); và van Sprikel *et al.*, *Immunology Today*, 21 (8), 391-397 (2000), và các tài liệu được trích dẫn trong đó.

Dược phẩm

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế được bào chế cùng với chất mang dược dụng. Dược phẩm này có thể tùy ý chứa một hoặc nhiều dược chất bổ sung, như một kháng thể hoặc dược chất khác. Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị kết hợp với, ví dụ một chất kích thích sinh miễn dịch khác, dược chất chống ung thư, chất chống virus, hoặc vaccin, sao cho kháng thể kháng LAG-3 tăng cường đáp ứng miễn dịch chống vaccin.

Dược phẩm này có thể chứa một số các tá dược bất kỳ. Các tá dược có thể được sử dụng bao gồm chất mang, chất hoạt động bề mặt, chất làm đặc hoặc chất nhũ hóa, tá dược dính rắn, chất gây thấm ổn định, chất làm tăng độ tan, chất màu, chất tạo hương, tá dược bao, tá dược rã, tá dược trơn, chất làm ngọt, chất bảo quản, chất đẳng trương, và hỗn hợp của chúng. Việc chọn lọc và sử dụng các tá dược thích hợp được hướng dẫn trong Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003), được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Tốt hơn nếu, dược phẩm này là thích hợp để sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, ngoài đường tiêu hóa, tiêm vào cột sống hoặc qua biểu bì (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc tiêm truyền). Tùy thuộc vào đường đưa thuốc, hoạt chất có thể được

bao trong tá dược để bảo vệ nó khỏi tác động của các axit và các điều kiện tự nhiên khác có thể làm nó bị mất hoạt tính. Thuật ngữ “ngoài đường tiêu hóa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các đường đưa thuốc không phải là qua đường tiêu hóa và tại chỗ, thường bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm và tiêm truyền tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm động mạch, nội tủy mạc, trong bao, tiêm vào hốc mắt, trong tim, tiêm trong da, tiêm màng bụng, qua khí quản, tiêm dưới da, qua biểu bì, tiêm vào khớp, dưới bao, dưới màng nhện, tiêm vào cột sống, gây tê ngoài màng cứng và tiêm vào xương ức. Theo cách khác, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng thông qua đường không phải ngoài đường tiêu hóa, như đường đưa thuốc tại chỗ, qua biểu bì hoặc niêm mạc, ví dụ dùng trong mũi, qua đường miệng, qua âm đạo, trực tràng, dưới lưỡi hoặc tại chỗ.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa các muối dược dụng. Thuật ngữ “muối dược dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ muối vẫn có hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất gốc và không mang lại tác dụng gây độc không mong muốn bất kỳ. Ví dụ về các muối như vậy bao gồm muối cộng axit và muối cộng bazơ. Các muối cộng axit bao gồm các muối có nguồn gốc từ các axit vô cơ không độc, như clo hydric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phospho và các axit tương tự, cũng như từ các axit hữu cơ không độc như axit mono- và dicarboxylic béo, axit alkanoic được thế bởi phenyl, axit hydroxy alkanoic, các axit thơm, các axit sulfonic béo và thơm và các axit tương tự. Các muối cộng bazơ bao gồm các muối có nguồn gốc từ kim loại kiềm thổ, như natri, kali, magie, canxi và các chất tương tự, cũng như từ các amin hữu cơ không độc, như N,N'-dibenzyletylendiamin, N-metylglucamin, chloroprocaine, cholin, dietanolamin, etylendiamin, procain và các chất tương tự.

Dược phẩm có thể ở dạng dung dịch hoặc phân tán trong nước vô trùng. Chúng cũng có thể được bào chế thành vi nhũ tương, liposom, hoặc cấu trúc được sắp xếp khác thích hợp với nồng độ dược chất cao.

Lượng hoạt chất có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn sẽ thay đổi tùy thuộc vào đối tượng cần điều trị và dạng dùng cụ thể và thường sẽ là lượng chế phẩm tạo ra tác dụng điều trị. Thông thường, trong số một trăm phần trăm, lượng này sẽ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 99% hoạt chất, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,1% đến 70%, tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 1% đến 30% hoạt chất kết hợp với chất mang dược dụng.

Chế độ liều được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, một viên thuốc to có thể được sử dụng, một số liều chia có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều này có thể được giảm hoặc tăng tỷ lệ như được chỉ định bởi tình trạng khẩn cấp của trường hợp điều trị. Đặc biệt có lợi khi bào chế chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thành dạng đơn vị liều để dễ dùng và đồng đều liều. Dạng đơn vị liều được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý phù hợp làm liều đơn nhất cho đối tượng cần điều trị; mỗi đơn vị chứa một lượng hoạt chất định trước được tính để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn cùng với chất mang được dùng cần thiết. Theo cách khác, kháng thể có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm giải phóng kéo dài, trong trường hợp này chỉ cần dùng ít thường xuyên hơn.

Đối với việc sử dụng kháng thể, liều nằm trong khoảng từ 0,0001mg/kg đến 100mg/kg, và thường là nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 5mg/kg, thể trọng của vật chủ. Ví dụ, các liều có thể là 0,3mg/kg thể trọng, 1mg/kg thể trọng, 3mg/kg thể trọng, 5mg/kg thể trọng hoặc 10mg/kg thể trọng hoặc nằm trong khoảng 1-10mg/kg. Chế độ điều trị được nêu làm ví dụ đòi hỏi dùng mỗi tuần một lần, mỗi hai tuần một lần, mỗi ba tuần một lần, mỗi bốn tuần một lần, mỗi tháng một lần, mỗi 3 tháng một lần hoặc mỗi ba đến 6 tháng một lần. Chế độ liều được ưu tiên đối với kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế bao gồm 1mg/kg thể trọng hoặc 3mg/kg thể trọng thông qua việc sử dụng tiêm tĩnh mạch, với kháng thể được cho bằng cách sử dụng một trong số các phác đồ dùng liều sau: (i) mỗi bốn tuần cho sáu liều, sau đó mỗi ba tháng; (ii) mỗi ba tuần; (iii) 3mg/kg thể trọng một lần tiếp theo 1mg/kg thể trọng mỗi ba tuần. Trong một số phương pháp, liều được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể trong huyết tương nằm trong khoảng 1-1000µg/mL và trong một số phương pháp, nồng độ này nằm trong khoảng từ 25 đến 300µg/mL.

Tốt hơn nếu “liều hữu hiệu điều trị” của kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế dẫn đến làm giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng bệnh, làm tăng tần suất và thời gian của các giai đoạn không có triệu chứng bệnh, hoặc phòng ngừa sự suy yếu hoặc khuyết tật do đau bệnh. Ví dụ, để điều trị các đối tượng mang khối u, tốt hơn nếu “liều hữu hiệu điều trị” ức chế sự sinh trưởng khối u xuống ít nhất khoảng 20%, tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 40%, tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 60%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 80% so với các đối tượng không được điều trị. Lượng hữu hiệu điều trị của hợp

được chất có thể làm giảm kích thước khối u, hoặc nếu không, cải thiện các triệu chứng ở đối tượng, thông thường là người hoặc có thể là một động vật có vú khác.

Dược phẩm này có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm chế phẩm cấy, miếng dán qua da, và hệ phân phối được kết vi nang. Polyme tương thích sinh học, có thể phân huỷ sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Ví dụ, xem *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Chế phẩm điều trị có thể được sử dụng thông qua các dụng cụ y tế như (1) dụng cụ tiêm dưới da không cần kim (ví dụ, US 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; và 4,596,556); (2) các bơm vi truyền (US 4,487,603); (3) dụng cụ dùng qua da (US 4,486,194); (4) dụng cụ tiêm truyền (US 4,447,233 và 4,447,224); và (5) dụng cụ thẩm thấu (US 4,439,196 và 4,475,196); được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế có thể được bào chế để bảo đảm phân bố *in vivo* chính xác. Ví dụ, để bảo đảm rằng các hợp dược chất theo sáng chế đi qua hàng rào máu-não, chúng có thể được bào chế thành liposom, có thể chứa thêm các nhóm hướng đích để làm tăng sự vận chuyển chọn lọc đến các tế bào hoặc cơ quan cụ thể. Ví dụ, xem US 4,522,811; 5,374,548; 5,416,016; và 5,399,331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685; Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038; Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180; Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134; Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090; Keinanen and Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; và Killion and Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Sử dụng và phương pháp theo sáng chế

Các kháng thể (chế phẩm, đặc hiệu kép, và thể tiếp hợp miễn dịch) theo sáng chế có nhiều ích lợi *in vitro* và *in vivo* bao gồm, ví dụ phát hiện LAG-3 hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng cách phong bế LAG-3. Theo một phương án ưu tiên, các kháng thể này là kháng thể của người. Các kháng thể này có thể được sử dụng cho các tế bào trong môi trường nuôi cấy, *in vitro* hoặc *ex vivo*, hoặc cho người, ví dụ *in vivo*, để tăng cường

tính miễn dịch trong nhiều trường hợp. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp biến đổi đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này dùng kháng thể, hoặc phân gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế sao cho đáp ứng miễn dịch ở đối tượng này được biến đổi. Tốt hơn nếu, đáp ứng này được tăng cường, được kích thích hoặc điều chỉnh lên.

Các đối tượng được ưu tiên bao gồm đối tượng bị bệnh cần tăng cường đáp ứng miễn dịch. Các phương pháp này đặc biệt thích hợp để điều trị đối tượng bị bệnh có rối loạn mà có thể được điều trị bằng cách gia tăng đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T). Theo một phương án cụ thể, các phương pháp này đặc biệt thích hợp để điều trị bệnh ung thư *in vivo*. Để đạt được sự tăng cường miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên, các kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng cùng với kháng nguyên cần quan tâm hoặc kháng nguyên này có thể đã có mặt trong đối tượng cần điều trị (ví dụ, đối tượng mang khối u hoặc mang virus). Khi các kháng thể đối với LAG-3 được sử dụng cùng với một chất khác, hai chất này có thể được sử dụng theo thứ tự hoặc đồng thời.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phát hiện sự có mặt kháng nguyên LAG-3 của người trong mẫu, hoặc đo lượng kháng nguyên LAG-3 của người, bao gồm bước cho mẫu này, và mẫu đối chứng, tiếp xúc với kháng thể đơn dòng của người, hoặc phân gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với LAG-3 của người, trong các điều kiện cho phép tạo ra phức hợp giữa kháng thể hoặc phân của nó và LAG-3 của người. Sau đó, phức hợp tạo ra được phát hiện, trong đó sự khác biệt của phức hợp tạo ra giữa mẫu so với mẫu đối chứng biểu thị sự có mặt của kháng nguyên LAG-3 của người trong mẫu. Ngoài ra, các kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế có thể được sử dụng để tinh chế LAG-3 của người thông qua việc tinh chế bằng ái lực miễn dịch.

Dựa vào khả năng của kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế ức chế gắn kết của LAG-3 với phân tử MHC nhóm II và kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng các kháng thể *in vitro* và *in vivo* để kích thích, tăng cường hoặc điều chỉnh tăng đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Ví dụ, sáng chế mô tả phương pháp kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên bao gồm bước cho tế bào T này tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế, sao cho đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được kích thích. Chỉ thị thích hợp bất kỳ của đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên có thể được sử dụng để đánh giá đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng

nguyên. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các chỉ thị thích hợp này bao gồm tăng mức tăng sinh tế bào T với sự có mặt của kháng thể và/hoặc tăng sản sinh xytokin với sự có mặt của kháng thể. Theo một phương án ưu tiên, việc sản sinh interleukin-2 bởi tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được kích thích.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên) ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này dùng kháng thể theo sáng chế sao cho đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên) ở đối tượng này được kích thích. Theo một phương án ưu tiên, đối tượng này là đối tượng mang khối u và đáp ứng miễn dịch kháng khối u được kích thích. Theo một phương án ưu tiên khác, đối tượng này là đối tượng mang virus và đáp ứng miễn dịch chống virus được kích thích.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế sinh trưởng tế bào khối u ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này dùng kháng thể theo sáng chế sao cho sự sinh trưởng của khối u được ức chế ở đối tượng này. Tiếp nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị nhiễm virus ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này dùng kháng thể theo sáng chế sao cho tình trạng nhiễm virus được điều trị ở đối tượng này.

Các phương pháp này và các phương pháp khác theo sáng chế được bàn luận chi tiết hơn dưới đây.

Bệnh ung thư

Việc phong bế LAG-3 bởi kháng thể có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với các tế bào ung thư ở đối tượng bị bệnh. Tiếp nữa, sáng chế mô tả việc điều trị đối tượng *in vivo* bằng cách sử dụng kháng thể kháng LAG-3 sao cho sự sinh trưởng của khối u ung thư được ức chế. Kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng đơn lẻ để ức chế sinh trưởng khối u ung thư. Theo cách khác, kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng kết hợp với các chất sinh miễn dịch khác, các biện pháp điều trị bệnh ung thư chuẩn, hoặc các kháng thể khác, như được mô tả dưới đây.

Tiếp nữa, sáng chế mô tả phương pháp ức chế sinh trưởng tế bào khối u ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này dùng kháng thể kháng LAG-3, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, với lượng hữu hiệu điều trị. Tốt hơn nếu, kháng thể này là kháng thể kháng LAG-3 của người (như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể của

người kháng LAG-3 của người được mô tả trong bản mô tả này). Ngoài ra, kháng thể này có thể là kháng thể kháng LAG-3 thể khảm hoặc nhân tạo.

Bệnh ung thư được ưu tiên mà sinh trưởng của nó có thể được ức chế bằng kháng thể theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư thường đáp ứng với điều trị miễn dịch. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các bệnh ung thư được ưu tiên điều trị bao gồm u melanin (ví dụ, u melanin ác tính di căn), bệnh ung thư thận (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô tế bào sáng), bệnh ung thư tuyến tiền liệt (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô tuyến tiền liệt kháng hormon), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết và bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ). Ngoài ra, sáng chế bao gồm khối u ác tính khó chữa hoặc tái diễn mà sự sinh trưởng của nó có thể được ức chế bằng kháng thể theo sáng chế.

Ví dụ về các bệnh ung thư khác có thể được điều trị bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, u melanin ác tính ở da hoặc trong mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư biểu mô ống dẫn trứng, bệnh ung thư biểu mô nội mạc tử cung, bệnh ung thư biểu mô cổ tử cung, bệnh ung thư biểu mô âm đạo, bệnh ung thư biểu mô âm hộ, bệnh Hodgkin, u lympho không Hodgkin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sarcoma mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh bạch cầu mạn tính hoặc cấp tính bao gồm bệnh bạch cầu thể tủy cấp tính, bệnh bạch cầu thể tủy mạn tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp, bệnh bạch cầu lympho mạn tính, khối u rắn từ thời thơ ấu, u lympho tế bào lympho, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận hoặc niệu quản, bệnh ung thư biểu mô bề thận, khối u của hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS), u lympho CNS nguyên phát, sự tạo mạch khối u, khối u cột sống, u thần kinh đệm của thân não, u tuyến của tuyến yên, sarcoma Kaposi, bệnh ung thư dạng qua biểu bì, bệnh ung thư tế bào hình vảy, u lympho tế bào T, bệnh ung thư gây ra do môi trường sống bao gồm bệnh ung thư gây ra do amiăng, và kết hợp các bệnh ung thư này. Sáng chế cũng hữu ích để điều trị bệnh ung thư di căn, đặc biệt là bệnh ung thư di căn biểu hiện PD-L1 (Iwai *et al.* (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Tùy ý, các kháng thể đối với LAG-3 có thể được kết hợp với chất sinh miễn dịch, như các tế bào ung thư, kháng nguyên của khối u được tinh chế (bao gồm các protein tái tổ hợp, peptit, và phân tử hydrat cacbon), tế bào, và tế bào được chuyển nạp bằng gen mã hóa xytokin kích thích miễn dịch (He *et al* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các vacxin từ khối u có thể được sử dụng bao gồm các peptit của kháng nguyên của u melanin, như các peptit của gp100, kháng nguyên MAGE, Trp-2, MART1 và/hoặc tyrosinaza, hoặc tế bào khối u được chuyển nạp để biểu hiện xytokin GM-CSF (được bàn luận thêm dưới đây).

Ở người, một số khối u đã được thể hiện là sinh miễn dịch như u melanin. Bằng cách tăng ngưỡng hoạt hóa tế bào T bằng cách phong bế LAG-3, các đáp ứng với khối u ở vật chủ có thể được hoạt hóa.

Việc phong bế LAG-3 có vẻ hiệu quả hơn khi được kết hợp với quy trình chủng ngừa. Nhiều phương pháp thử nghiệm để chủng ngừa kháng khối u đã được bộc lộ (*xem Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; cũng xem Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita *et al.* (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition*). Theo một trong số các phương pháp này, vacxin được bào chế bằng cách sử dụng các tế bào khối u tự thân hoặc dị sinh. Các vacxin chứa tế bào này đã được thể hiện là rất hiệu quả khi các tế bào khối u này được tải nạp để biểu hiện GM-CSF. GM-CSF đã được thể hiện là chất hoạt hóa sự trình diện kháng nguyên có hiệu lực đối với việc chủng ngừa khối u (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

Nghiên cứu biểu hiện gen và các mô hình biểu hiện gen quy mô lớn trong các khối u khác nhau đã đưa đến khái niệm được gọi là kháng nguyên đặc hiệu khối u (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). Trong nhiều trường hợp, các kháng nguyên đặc hiệu khối u này là các kháng nguyên biệt hóa được biểu hiện trong khối u và trong tế bào mà từ đó khối u xuất hiện, ví dụ kháng nguyên tế bào hắc tố gp100, kháng nguyên MAGE, và Trp-2. Quan trọng hơn, nhiều trong số các kháng nguyên này có thể được thể hiện là đích của tế bào T đặc hiệu khối u được tìm thấy trong vật chủ. Việc phong bế LAG-3 có thể được sử dụng kết hợp với việc thu các protein tái tổ hợp và/hoặc các peptit được biểu

hiện trong khối u để tạo ra đáp ứng miễn dịch với các protein này. Các protein này thường được hệ miễn dịch cho là các tự kháng nguyên và do đó, hệ miễn dịch dung nạp được chúng. Kháng nguyên của khối u có thể bao gồm protein telomeraza, cần để tổng hợp điểm cuối của nhiễm sắc thể và được biểu diễn trong nhiều hơn 85% bệnh ung thư của người và chỉ trong một số lượng giới hạn mô sinh dưỡng (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Các mô sinh dưỡng này có thể được bảo vệ khỏi sự tấn công miễn dịch bằng nhiều cách khác nhau). Kháng nguyên của khối u cũng có thể là “các kháng nguyên tân tạo” được biểu hiện trong tế bào ung thư do các đột biến sinh dưỡng làm thay đổi trình tự protein hoặc tạo ra protein dung hợp giữa hai trình tự không liên quan (*tức là bcr-abl trong nhiễm sắc thể Philadelphia*), hoặc kiểu gen cá thể từ khối u của tế bào B.

Các vacxin kháng khối u khác có thể bao gồm các protein từ virus liên quan đến bệnh ung thư của người như virus gây u nhú ở người (Human Papilloma Virus- HPV), virus gây bệnh viêm gan (HBV và HCV) và virus Herpes liên quan đến bệnh sarcoma Kaposi (Kaposi's Herpes Sarcoma Virus - KHSV). Một dạng khác của kháng nguyên đặc hiệu khối u có thể được sử dụng kết hợp với việc phong bế LAG-3 là protein sốc nhiệt (heat shock protein - HSP) tinh chế được phân lập từ chính mô khối u. Các protein sốc nhiệt này chứa các mảnh protein từ các tế bào khối u và các HSP này có hiệu quả phân phối cao đến các tế bào trình diện kháng nguyên để gây ra sự miễn dịch khối u (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278:117-120).

Các tế bào đuôi gai (dendritic cell - DC) là tế bào trình diện kháng nguyên có hiệu lực có thể được sử dụng để mời các đáp ứng đặc hiệu kháng nguyên. Các DC có thể được sản sinh *ex vivo* và được nạp bởi các kháng nguyên protein và peptit khác nhau cũng như dịch chiết tế bào khối u (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Các DC cũng có thể được tải nạp bằng cách di truyền để biểu hiện các kháng nguyên của khối u. Các DC cũng được dung hợp trực tiếp với các tế bào khối u nhằm mục đích gây miễn dịch (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Là phương pháp chủng ngừa, việc gây miễn dịch bằng DC có thể được kết hợp hiệu quả với việc phong bế LAG-3 để hoạt hóa các đáp ứng kháng khối u có hiệu lực hơn.

Việc phong bế LAG-3 cũng có thể được kết hợp với các biện pháp điều trị bệnh ung thư chuẩn. Việc phong bế LAG-3 có thể được kết hợp hiệu quả với chế độ hóa điều trị. Trong các trường hợp này, có thể giảm liều của dược chất hóa trị liệu được sử dụng

(Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Ví dụ về kết hợp như vậy là kháng thể kháng LAG-3 kết hợp với decarbazine để điều trị u melanin. Một ví dụ khác về kết hợp như vậy là kháng thể kháng LAG-3 kết hợp với interleukin-2 để điều trị u melanin. Cơ sở khoa học hợp lý đằng sau việc sử dụng kết hợp việc phong bế LAG-3 và hóa điều trị là sự chết tế bào, là kết quả của tác động gây độc tế bào của hầu hết các dược chất hóa trị liệu, sẽ dẫn đến tăng mức kháng nguyên của khối u trong quá trình trình diện kháng nguyên. Các phương pháp điều trị kết hợp khác có thể dẫn đến tác dụng hiệp đồng với việc phong bế LAG-3 thông qua sự chết tế bào là việc chiếu xạ, phẫu thuật, và ức chế hormon. Mỗi trong số các quá trình này tạo ra nguồn kháng nguyên của khối u trong vật chủ. Các chất ức chế sự tạo mạch cũng có thể được kết hợp với việc phong bế LAG-3. Việc ức chế sự tạo mạch dẫn đến chết tế bào khối u, điều này có thể cung cấp kháng nguyên của khối u cho quá trình trình diện kháng nguyên của vật chủ.

Các kháng thể phong bế LAG-3 cũng có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể đặc hiệu kép hướng đích các tế bào hiệu ứng biểu hiện thụ thể Fc α hoặc Fc γ đến các tế bào khối u (ví dụ, xem patent Mỹ số 5,922,845 và 5,837,243). Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được sử dụng hướng đích hai kháng nguyên riêng rẽ. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép của kháng nguyên kháng thụ thể Fc/kháng khối u (ví dụ, Her-2/neu) đã được sử dụng để hướng đích đại thực bào đến vị trí của khối u. Việc hướng đích này có thể hoạt hóa các đáp ứng đặc hiệu khối u hiệu quả hơn. Nhánh tế bào T của các đáp ứng này sẽ được tăng nhờ việc sử dụng phong bế LAG-3. Theo cách khác, kháng nguyên có thể được phân phối trực tiếp đến các DC bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu kép gắn kết với kháng nguyên của khối u và chất đánh dấu bề mặt tế bào đặc hiệu với tế bào đuôi gai.

Khối u tránh sự giám sát miễn dịch của vật chủ bằng nhiều cơ chế. Nhiều trong số các cơ chế này có thể chiến thắng bằng cách làm bất hoạt các protein được biểu hiện bởi khối u và có tác dụng ức chế miễn dịch. Các protein này bao gồm, trong số các chất khác, TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), và phối tử Fas (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Các kháng thể đối với mỗi trong số các chất này có thể được sử dụng kết hợp với kháng LAG-3 để chống lại tác dụng của chất ức chế miễn dịch và làm thuận lợi cho đáp ứng miễn dịch khối u bởi vật chủ.

Các kháng thể khác hoạt hóa đáp ứng miễn dịch của vật chủ có thể được sử dụng kết hợp với kháng LAG-3. Các kháng thể này bao gồm các phân tử trên bề mặt của tế bào đuôi gai hoạt hóa chức năng DC và việc trình diện kháng nguyên. Các kháng thể kháng CD40 có thể thay thế hiệu quả cho hoạt tính tế bào T hỗ trợ (Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478) và có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể LAG-3 (Ito *et al.* (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Các kháng thể hoạt hóa đối với các phân tử đồng kích thích tế bào T như CTLA-4 (ví dụ, patent Mỹ số 5,811,097), OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), và ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266) cũng có thể tăng mức hoạt hóa tế bào T.

Việc ghép tủy xương hiện đang được sử dụng để điều trị nhiều khối u có nguồn gốc tạo máu. Trong khi việc ghép với bệnh vật chủ là kết quả của việc điều trị này, lợi ích điều trị có thể thu được từ việc ghép với đáp ứng khối u. Việc phong bế LAG-3 có thể được sử dụng để làm tăng hiệu quả của tế bào T đặc hiệu khối u được ghép vào thể cho.

Cũng có một số quy trình điều trị thử nghiệm bao gồm hoạt hóa và khuếch đại *ex vivo* các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên và chuyển nhận các tế bào này vào trong thể nhận để kích thích các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên kháng khối u (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng để hoạt hóa các đáp ứng tế bào T với các tác nhân gây nhiễm như việc hoạt hóa CMV. *Ex vivo* với sự có mặt của các kháng thể kháng LAG-3 có thể làm tăng tần suất và hoạt tính của các tế bào T được chuyển nhận.

Bệnh lây nhiễm

Các phương pháp theo sáng chế khác được sử dụng để điều trị các đối tượng bị bệnh đã được tiếp xúc với các độc tố hoặc mầm bệnh cụ thể. Tiếp nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh lây nhiễm ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này dùng kháng thể kháng LAG-3, hoặc phân gán kết kháng nguyên của nó, sao cho đối tượng này điều trị được bệnh lây nhiễm. Tốt hơn nếu, kháng thể này là kháng thể của người kháng LAG-3 của người (như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG-3 của người được mô tả trong bản mô tả này). Ngoài ra, kháng thể này có thể là kháng thể khảm hoặc nhân tạo.

Tương tự như việc sử dụng kháng thể này cho khối u như được mô tả trên đây, việc phong bế LAG-3 qua trung gian kháng thể có thể được sử dụng đơn lẻ, hoặc dưới dạng tá chất, kết hợp với các vaccin, để kích thích đáp ứng miễn dịch với mầm bệnh, độc tố, và tự kháng nguyên. Các ví dụ về mầm bệnh mà phương pháp điều trị này có thể đặc biệt hữu ích, bao gồm các mầm bệnh mà hiện chưa có vaccin hiệu quả, hoặc các mầm bệnh mà các vaccin thông thường ít có hiệu quả đầy đủ. Các mầm bệnh này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, HIV, Hepatitis (A, B, & C), Influenza, Herpes, Giardia, Malaria, *Leishmania*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Việc phong bế LAG-3 là đặc biệt hữu ích chống bệnh lây nhiễm được gây ra bởi các tác nhân như HIV có kháng nguyên thay đổi trong quá trình nhiễm bệnh. Các epitop mới này được nhận diện là ngoại lai ở thời điểm dùng kháng LAG-3 của người, do đó, gây ra đáp ứng tế bào T mạnh không giảm bởi tín hiệu âm tính thông qua LAG-3.

Một số ví dụ về các virus gây bệnh gây ra bệnh lây nhiễm có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm HIV, virus gây bệnh viêm gan (A, B, hoặc C), virus gây bệnh herpes (ví dụ, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, và CMV, virus Epstein Barr), adenovirus, virus gây bệnh cúm, flavivirus, echovirus, rhinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus hợp bào hô hấp, virus gây bệnh quai bị, rotavirus, virus gây bệnh sởi, virus gây bệnh sởi Đức, parvovirus, virus gây bệnh đậu mùa, virus HTLV (Human T-cell Lymphotropic Virus - virus gây u lympho T ở người), virus gây bệnh sốt xuất huyết, papillomavirus, virus gây bệnh u mềm, poliovirus, virus gây bệnh dại, virus JC và virus gây bệnh viêm não do arbovirus.

Một số ví dụ về vi khuẩn gây bệnh gây ra bệnh lây nhiễm có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm *chlamydia*, vi khuẩn *rickettsia*, *mycobacteria*, *staphylococci*, *streptococci*, *pneumococci*, *meningococci* và *gonococci*, *klebsiella*, *proteus*, *serratia*, *pseudomonas*, *legionella*, *diphtheria*, *salmonella*, *bacilli*, *cholera*, *tetanus*, *botulism*, *anthrax*, *plague*, *leptospirosis*, và vi khuẩn gây bệnh Lyme.

Một số ví dụ về nấm gây bệnh gây ra bệnh lây nhiễm có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, v.v.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, v.v.), chi *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* và *Histoplasma capsulatum*.

Một số ví dụ về ký sinh trùng gây bệnh gây ra bệnh lây nhiễm có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Trong toàn bộ các phương pháp trên, việc phong bế LAG-3 có thể được kết hợp với dạng điều trị miễn dịch khác như điều trị bằng xytokin (ví dụ, interferon, GM-CSF, G-CSF, IL-2), hoặc điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép, làm tăng trình diện kháng nguyên của khối u (ví dụ, xem Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Các phản ứng tự miễn

Các kháng thể kháng LAG-3 có thể gây ra và khuếch đại các đáp ứng tự miễn. Thực vậy, việc cảm ứng các đáp ứng kháng khối u bằng cách sử dụng tế bào khối u và vaccin chứa peptit khám phá ra rằng nhiều đáp ứng kháng khối u liên quan đến khả năng phản ứng tự kháng (van Elsas *et al.* (2001) *J. Exp. Med.* 194:481-489; Overwijk, *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000) nêu trên; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4). Do đó, có thể xem xét việc sử dụng phong bế kháng LAG-3 kết hợp với các protein tự thân khác nhau để đưa ra quy trình chủng ngừa để tạo ra các đáp ứng miễn dịch chống các protein tự thân này một cách hiệu quả để điều trị bệnh. Ví dụ, bệnh Alzheimer liên quan đến sự tích tụ không thích hợp của peptit A β trong các mảng lắng đọng dạng tinh bột trong não; đáp ứng của kháng thể chống dạng tinh bột có thể làm sạch các mảng lắng đọng dạng tinh bột này (Schenk *et al.*, (1999) *Nature* 400: 173-177).

Các protein tự thân khác cũng có thể được sử dụng làm đích như IgE để điều trị bệnh hen và dị ứng, và TNF α để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Cuối cùng, đáp ứng của kháng thể với các hormon khác nhau có thể được gây ra nhờ việc sử dụng kháng thể kháng LAG-3. Đáp ứng trung hòa kháng thể với các hormon sinh sản có thể được sử dụng để tránh thụ thai. Đáp ứng trung hòa kháng thể với hormon và các yếu tố hòa tan khác là cần thiết cho sự sinh trưởng của khối u cụ thể cũng có thể được coi là đích chủng ngừa có thể.

Các phương pháp tương tự như đã mô tả trên đây để sử dụng kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng để gây ra đáp ứng tự miễn điều trị để điều trị cho các đối tượng bị bệnh có sự tích tụ không thích hợp của các tự kháng nguyên khác, như các mảng lắng đọng dạng tinh bột, bao gồm A β trong bệnh Alzheimer, xytokin như TNF α , và IgE.

Vaccin

Các kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên bằng cách dùng phối hợp kháng thể kháng LAG-3 với kháng nguyên cần quan tâm (ví dụ, vaccin). Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này dùng: (i) kháng nguyên; và (ii) kháng thể kháng LAG-3, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, sao cho đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên ở đối tượng được tăng cường. Tốt hơn nếu, kháng thể này là kháng thể của người kháng LAG-3 của người (như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG-3 của người được mô tả trong bản mô tả này). Ngoài ra, kháng thể này có thể là kháng thể khảm hoặc nhân tạo. Kháng nguyên này có thể là, ví dụ kháng nguyên của khối u, kháng nguyên của virus, kháng nguyên của vi khuẩn hoặc kháng nguyên từ mầm bệnh. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các kháng nguyên này bao gồm các kháng nguyên được bàn luận trong các phần nêu trên, như kháng nguyên của khối u (hoặc vaccin từ khối u) nêu trên, hoặc kháng nguyên từ virus, vi khuẩn hoặc mầm bệnh khác được mô tả trên đây.

Các đường đưa thuốc thích hợp của chế phẩm chứa kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng của người, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép và thể tiếp hợp miễn dịch) theo sáng chế *in vivo* và *in vitro* là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được lựa chọn bởi chuyên gia có trình độ trung bình. Ví dụ, chế phẩm chứa kháng thể có thể được sử dụng bằng cách tiêm (ví dụ, tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da). Các liều thích hợp của các phân tử được sử dụng sẽ phụ thuộc vào tuổi và cân nặng của đối tượng và nồng độ và/hoặc dạng bào chế của dược phẩm chứa kháng thể này.

Như đã mô tả trên đây, kháng thể kháng LAG-3 của người theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều dược chất khác, ví dụ chất gây độc tế bào, chất gây độc phóng xạ hoặc chất ức chế miễn dịch. Kháng thể có thể được liên kết với chất này (dưới dạng phức hợp miễn dịch) hoặc có thể được sử dụng riêng rẽ với chất này. Trong trường hợp sau (việc sử dụng riêng rẽ), kháng thể này có thể được sử dụng trước,

sau hoặc đồng thời với chất này hoặc có thể được sử dụng kết hợp với các phương pháp điều trị đã biết khác, ví dụ phương pháp điều trị chống ung thư, ví dụ xạ trị. Các dược chất này bao gồm, trong số các chất khác, dược chất chống ung thư như doxorubicin (adriamycin), cisplatin bleomycin sulfat, carmustine, chlorambucil, dacarbazine và xyclophosphamid hydroxyure mà, bản thân chúng, chỉ có hiệu quả ở mức gây độc hoặc dưới mức gây độc cho đối tượng bị bệnh. Cisplatin được sử dụng tiêm tĩnh mạch với liều 100mg/mL mỗi bốn tuần một lần và adriamycin được sử dụng tiêm tĩnh mạch với liều 60-75mg/mL mỗi 21 ngày một lần. Việc sử dụng phối hợp các kháng thể kháng LAG-3 của người, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế với các dược chất hóa trị liệu tạo ra hai dược chất chống ung thư hoạt động thông qua các cơ chế khác nhau thu được tác dụng gây độc tế bào cho các tế bào khối u của người. Việc sử dụng phối hợp này có thể giải quyết các vấn đề do sự phát triển tính kháng thuốc hoặc thay đổi tính kháng nguyên của tế bào khối u làm cho chúng không phản ứng với kháng thể.

Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế (ví dụ, kháng thể của người, phân tử đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch) và hướng dẫn để sử dụng. Kit này có thể còn chứa ít nhất một chất phản ứng bổ sung, hoặc một hoặc nhiều kháng thể của người bổ sung theo sáng chế (ví dụ, kháng thể của người có hoạt tính bổ sung gắn kết với epitop trong kháng nguyên LAG-3 phân biệt với kháng thể của người thứ nhất). Các kit thường bao gồm nhãn chỉ ra mục đích sử dụng đã định của các thành phần của kit. Thuật ngữ nhãn bao gồm vật liệu viết tay hoặc được ghi bất kỳ được cung cấp trên hoặc với kit, hoặc nếu không, kèm theo kit.

Phương pháp điều trị kết hợp

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị kết hợp trong đó kháng thể kháng LAG-3 (hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó) theo sáng chế được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều kháng thể bổ sung có hiệu quả trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch để từ đó làm tăng cường, kích thích hoặc điều chỉnh tăng đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này dùng kháng thể kháng LAG-3 và một hoặc nhiều kháng thể kích thích sinh miễn dịch bổ sung, như kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1 và/hoặc kháng thể kháng CTLA-4, sao cho đáp ứng miễn dịch được kích thích ở đối tượng này, ví dụ để ức chế sự sinh trưởng khối u hoặc để kích thích

đáp ứng chống virus. Theo một phương án khác, đối tượng này được sử dụng kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng PD-1. Theo một phương án khác, đối tượng này được sử dụng kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng PD-L1. Theo một phương án khác, đối tượng này được sử dụng kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4. Theo một phương án, kháng thể kháng LAG-3 là kháng thể của người, như kháng thể theo sáng chế này. Theo cách khác, kháng thể kháng LAG-3 có thể là, ví dụ kháng thể khảm hoặc nhân tạo (ví dụ, được tạo ra từ mAb kháng LAG-3 của chuột). Theo một phương án khác, ít nhất một kháng thể kích thích sinh miễn dịch bổ sung (ví dụ, kháng thể kháng PD-1, kháng PD-L1 và/hoặc kháng CTLA-4) là kháng thể của người. Theo cách khác, ít nhất một kháng thể kích thích sinh miễn dịch bổ sung có thể là, ví dụ kháng thể khảm hoặc nhân tạo (ví dụ, được tạo ra từ kháng thể kháng PD-1, kháng PD-L1 và/hoặc kháng CTLA-4 của chuột).

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư), bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể LAG-3 và kháng thể CTLA-4. Theo các phương án khác, kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị, kháng thể kháng CTLA-4 được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị, hoặc cả hai kháng thể được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị. Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 với liều thấp hơn liều điều trị. Theo một số phương án, đối tượng này là người. Theo các phương án khác, kháng thể kháng CTLA-4 là kháng thể đơn dòng trình tự của người 10D1 (được mô tả trong WO01/14424) và kháng thể kháng LAG-3 là kháng thể đơn dòng trình tự của người, như LAG3.5 được mô tả trong bản mô tả này. Các kháng thể kháng CTLA-4 khác gồm trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm, ví dụ các kháng thể được bộc lộ trong: WO98/42752; WO00/37504; patent Mỹ số 6,207,156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206); và Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. Theo một số phương án, kháng thể kháng CTLA-4 gắn kết với CTLA-4 của người với hằng số K_D bằng 5×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với CTLA-4 của người với hằng số K_D bằng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với CTLA-4 của người với hằng số K_D

bằng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, hoặc gắn kết với CTLA-4 của người với hằng số K_D nằm trong khoảng từ 1×10^{-8} M đến 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư), bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể LAG-3 và kháng thể PD-1. Theo các phương án khác, kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị, kháng thể kháng PD-1 được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị, hoặc cả hai kháng thể được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị. Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng PD-1 với liều thấp hơn liều điều trị. Theo một số phương án, đối tượng này là người. Theo một số phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 là kháng thể đơn dòng trình tự của người và kháng thể kháng LAG-3 là kháng thể đơn dòng trình tự của người, như LAG3.5 được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ về các kháng thể kháng PD-1 trình tự của người bao gồm 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 và 4A11, được mô tả trong WO06/121168. Các kháng thể kháng PD-1 khác bao gồm, ví dụ lambrolizumab (WO2008/156712), và AMP514 (WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, WO2010/098788). Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 gắn kết với PD-1 của người với hằng số K_D bằng 5×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với PD-1 của người với hằng số K_D bằng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với PD-1 của người với hằng số K_D bằng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, hoặc gắn kết với PD-1 của người với hằng số K_D nằm trong khoảng từ 1×10^{-8} M đến 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư), bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể LAG-3 và kháng thể PD-L1. Theo các phương án khác, kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị, kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị, hoặc cả hai kháng thể được sử dụng ở liều thấp hơn liều điều trị. Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng PD-L1 với liều thấp hơn liều điều trị. Theo một số phương án, đối tượng này là người. Theo các phương án khác, kháng thể kháng PD-L1 là kháng thể đơn dòng trình tự của người và kháng thể kháng LAG-3 là kháng thể đơn dòng

trình tự của người, như LAG3.5 được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ về các kháng thể kháng PD-L1 trình tự của người bao gồm 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 và 13G4, được mô tả trong WO07/005874. Các kháng thể kháng PD-L1 khác bao gồm, ví dụ MPDL3280A (RG7446) (WO2010/077634), MEDI4736 (WO2011/066389), và MDX1105 (WO2007/005874). Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-L1 gắn kết với PD-L1 của người với hằng số K_D bằng 5×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với PD-L1 của người với hằng số K_D bằng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với PD-L1 của người với hằng số K_D bằng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, hoặc gắn kết với PD-L1 của người với hằng số K_D nằm trong khoảng từ 1×10^{-8} M đến 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn.

Việc phong bế LAG-3 và một hoặc nhiều kháng nguyên đích thứ hai như CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 bởi kháng thể có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch với các tế bào ung thư ở đối tượng bị bệnh. Bệnh ung thư mà sinh trưởng của nó có thể được ức chế bằng kháng thể theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư thường đáp ứng với điều trị miễn dịch. Ví dụ điển hình về bệnh ung thư được điều trị bằng phương pháp điều trị kết hợp theo sáng chế bao gồm các bệnh ung thư nêu trên trong phần bàn luận về phương pháp điều trị đơn trị bằng kháng thể kháng LAG-3.

Theo một số phương án, việc kết hợp các dược chất kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng đồng thời dưới dạng chế phẩm đơn trong chất mang dược dụng, hoặc đồng thời dưới dạng các chế phẩm riêng rẽ với mỗi kháng thể trong chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, việc kết hợp các dược chất kháng thể có thể được sử dụng lần lượt. Ví dụ, kháng thể kháng CTLA-4 và kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng lần lượt, như kháng thể kháng CTLA-4 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng thứ hai, hoặc kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng CTLA-4 được sử dụng thứ hai. Ngoài ra, kháng thể kháng PD-1 và kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng lần lượt, như kháng thể kháng PD-1 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng thứ hai, hoặc kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng PD-1 được sử dụng thứ hai. Ngoài ra, kháng thể kháng PD-L1 và kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng lần lượt, như kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng LAG-3

được sử dụng thứ hai, hoặc kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng thứ hai.

Ngoài ra, nếu nhiều hơn một liều của phương pháp điều trị kết hợp được sử dụng lần lượt, thì thứ tự của việc sử dụng lần lượt có thể được đảo chiều hoặc được giữ theo thứ tự giống nhau ở mỗi thời điểm dùng, việc sử dụng lần lượt có thể được kết hợp với việc sử dụng đồng thời, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, lần dùng thứ nhất của việc kết hợp, kháng thể kháng CTLA-4 và kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng đồng thời, lần dùng thứ hai có thể là lần lượt với kháng CTLA-4 thứ nhất và kháng LAG-3 thứ hai, và lần dùng thứ ba có thể là lần lượt với kháng LAG-3 thứ nhất và kháng CTLA-4 thứ hai, v.v.. Ngoài ra, lần dùng thứ nhất của việc kết hợp, kháng thể kháng PD-1 và kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng đồng thời, lần dùng thứ hai có thể là lần lượt với kháng PD-1 thứ nhất và kháng LAG-3 thứ hai, và lần dùng thứ ba có thể là lần lượt với kháng LAG-3 thứ nhất và kháng PD-1 thứ hai, v.v.. Ngoài ra, lần dùng thứ nhất của việc kết hợp, kháng thể kháng PD-L1 và kháng thể kháng LAG-3 có thể được sử dụng đồng thời, lần dùng thứ hai có thể là lần lượt với kháng PD-L1 thứ nhất và kháng LAG-3 thứ hai, và lần dùng thứ ba có thể là lần lượt với kháng LAG-3 thứ nhất và kháng PD-L1 thứ hai, v.v.. Một phác đồ dùng liều điển hình khác có thể bao gồm lần dùng thứ nhất là lần lượt với kháng LAG-3 thứ nhất và kháng CTLA-4 (và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1) thứ hai, và các lần dùng tiếp theo có thể là đồng thời.

Tùy ý, kết hợp giữa kháng LAG-3 và một hoặc nhiều kháng thể bổ sung (ví dụ, các kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1) có thể được kết hợp thêm với chất sinh miễn dịch, như tế bào ung thư, kháng nguyên của khối u được tinh chế (bao gồm các protein tái tổ hợp, peptit, và phân tử hydrat cacbon), các tế bào, và các tế bào được chuyển nạp bằng các gen mã hóa xytokin kích thích miễn dịch (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các vaccin từ khối u có thể được sử dụng bao gồm các peptit của kháng nguyên của u melanin, như các peptit của gp100, kháng nguyên MAGE, Trp-2, MART1 và/hoặc tyrosinaza, hoặc tế bào khối u được chuyển nạp để biểu hiện xytokin GM-CSF (được bàn luận thêm dưới đây). Việc phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 kết hợp có thể được kết hợp thêm với quy trình chủng ngừa, như quy trình bất kỳ trong số

các quy trình chủng ngừa được bàn luận chi tiết trên đây đối với phương pháp điều trị đơn trị bằng các kháng thể kháng LAG-3.

Việc phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 kết hợp cũng có thể được kết hợp thêm với các biện pháp điều trị bệnh ung thư chuẩn. Ví dụ, việc phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 kết hợp có thể được kết hợp hiệu quả với chế độ hóa điều trị. Trong các trường hợp này, có thể giảm liều của dược chất hóa trị liệu khác được sử dụng với kết hợp theo sáng chế (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Ví dụ về kết hợp như vậy là kết hợp giữa kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1 còn kết hợp với decarbazine để điều trị u melanin. Một ví dụ khác là kết hợp giữa kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1 còn kết hợp với interleukin-2 để điều trị u melanin. Cơ sở khoa học hợp lý đằng sau việc sử dụng kết hợp việc phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 với hóa điều trị là sự chết tế bào, là kết quả của tác động gây độc tế bào của hầu hết các dược chất hóa trị liệu, sẽ dẫn đến tăng mức kháng nguyên của khối u trong quá trình trình diện kháng nguyên. Các phương pháp điều trị kết hợp khác có thể dẫn đến tác dụng hiệp đồng với việc phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 kết hợp thông qua sự chết tế bào bao gồm việc chiếu xạ, phẫu thuật, hoặc ức chế hormon. Mỗi trong số các quá trình này tạo ra nguồn kháng nguyên của khối u trong vật chủ. Các chất ức chế sự tạo mạch cũng có thể được kết hợp với việc phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 kết hợp. Việc ức chế sự tạo mạch dẫn đến chết tế bào khối u, điều này có thể là nguồn cung cấp kháng nguyên của khối u cho quá trình trình diện kháng nguyên của vật chủ.

Việc kết hợp các kháng thể phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 cũng có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể đặc hiệu kép hướng đích các tế bào hiệu ứng biểu hiện thụ thể Fc α hoặc Fc γ đến các tế bào khối u (ví dụ, xem patent Mỹ số 5,922,845 và 5,837,243). Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được sử dụng hướng đích hai kháng nguyên riêng rẽ. Nhánh tế bào T của các đáp ứng này sẽ được tăng nhờ việc sử dụng phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 kết hợp.

Theo một ví dụ khác, kết hợp giữa kháng LAG-3 và các kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1 có thể được sử dụng kết hợp với

các kháng thể chống ung thư, như Rituxan[®] (rituximab), Herceptin[®] (trastuzumab), Bexxar[®] (tositumomab), Zevalin[®] (ibritumomab), Campath[®] (alemtuzumab), Lymphocide[®] (epratuzumab), Avastin[®] (bevacizumab), và Tarceva[®] (erlotinib), và các chất tương tự. Bằng cách đưa ví dụ và không bị ràng buộc về mặt lý thuyết, việc điều trị bằng kháng thể chống ung thư hoặc kháng thể chống ung thư được tiếp hợp với độc tố có thể dẫn đến sự chết tế bào ung thư (ví dụ, các tế bào khối u), điều này có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch qua trung gian CTLA-4, PD-1, PD-L1 hoặc LAG-3. Trong một phương án được nêu làm ví dụ, việc điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, khối u ung thư) có thể bao gồm kháng thể chống ung thư kết hợp với kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1, đồng thời hoặc lần lượt hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, điều này có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch kháng khối u bởi vật chủ.

Khối u tránh sự giám sát miễn dịch của vật chủ bằng nhiều cơ chế. Nhiều trong số các cơ chế này có thể chiến thắng bằng cách làm bất hoạt các protein được biểu hiện bởi khối u và có tác dụng ức chế miễn dịch. Các protein này bao gồm, trong số các protein khác, TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), và phối tử Fas (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Theo một ví dụ khác, các kháng thể đối với mỗi trong số các chất này có thể được kết hợp tiếp với tổ hợp kháng thể kháng LAG-3 và kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 để chống lại tác dụng của chất ức chế miễn dịch và làm thuận lợi cho đáp ứng miễn dịch kháng khối u bởi vật chủ.

Các kháng thể khác có thể được sử dụng để hoạt hóa đáp ứng miễn dịch của vật chủ có thể được sử dụng kết hợp tiếp với tổ hợp kháng thể kháng LAG-3 và kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1. Các kháng thể này bao gồm các phân tử trên bề mặt của tế bào đuôi gai hoạt hóa chức năng DC và việc trình diện kháng nguyên. Các kháng thể kháng CD40 (Ridge *et al.*, *nêu trên*) có thể được sử dụng kết hợp với tổ hợp kháng LAG-3 và kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 (Ito *et al.*, *nêu trên*). Các kháng thể hoạt hóa khác đối với các phân tử đồng kích thích tế bào T (Weinberg *et al.*, *nêu trên*, Melero *et al.*, *nêu trên*, Hutloff *et al.*, *nêu trên*) cũng có thể làm tăng mức hoạt hóa tế bào T.

Như được bàn luận trên đây, việc ghép tủy xương hiện đang được sử dụng để điều trị nhiều khối u có nguồn gốc tạo máu. Việc phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 kết hợp có thể được sử dụng để làm tăng hiệu quả của tế bào T đặc hiệu khối u được ghép vào thể cho.

Một số quy trình điều trị thử nghiệm bao gồm hoạt hóa và khuếch đại *ex vivo* các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên và chuyển nhận các tế bào này vào trong thể nhận để kích thích các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên kháng khối u (Greenberg & Riddell, nêu trên). Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng để hoạt hóa các đáp ứng tế bào T với các tác nhân gây nhiễm như việc hoạt hóa CMV. *Ex vivo* với sự có mặt của kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1 có thể được mong đợi là làm tăng tần suất và hoạt tính của các tế bào T được chuyển nhận.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư) bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 với liều thấp hơn liều điều trị. Ví dụ, các phương pháp theo sáng chế phục vụ cho phương pháp làm giảm tỷ lệ mắc bệnh viêm ruột kết hoặc bệnh tiêu chảy gây ra do được chất kháng thể kích thích sinh miễn dịch bằng cách cho đối tượng bị bệnh dùng steroid không hấp thu được. Do đối tượng bị bệnh bất kỳ sẽ nhận được chất kháng thể kích thích sinh miễn dịch có nguy cơ phát triển bệnh viêm ruột kết hoặc bệnh tiêu chảy gây ra do kháng thể này, nên toàn bộ tập hợp đối tượng bị bệnh là thích hợp để điều trị theo các phương pháp theo sáng chế. Mặc dù, các steroid đã được sử dụng để điều trị bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD) và phòng ngừa sự làm trầm trọng của IBD, chúng chưa được sử dụng để phòng ngừa (làm giảm tỷ lệ mắc) IBD ở các đối tượng bị bệnh chưa được chẩn đoán bị IBD. Các tác dụng phụ quan trọng liên quan đến các steroid, kể cả các steroid không hấp thu được, làm chán nản việc sử dụng phòng bệnh.

Theo các phương án khác, việc kết hợp phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 (*tức là*, các được chất kháng thể kích thích sinh miễn dịch kháng LAG-3 và kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1) có thể được kết hợp thêm với việc sử dụng steroid không hấp thu được bất kỳ. Khi được sử

dụng trong bản mô tả, “steroid không hấp thu được” là glucocorticoid có chuyển hóa lần đầu qua gan rộng vì vậy, sau khi chuyển hóa trong gan, sinh khả dụng của steroid này thấp, *tức là*, nhỏ hơn 20%. Theo một phương án thực hiện sáng chế, steroid không hấp thu được là budesonide. Budesonide là glucocorticosteroid tác động tại chỗ, được chuyển hóa rộng, chủ yếu bởi gan, sau khi dùng qua đường miệng. ENTOCORT EC[®] (Astra-Zeneca) là chế phẩm budesonide dùng qua đường miệng phụ thuộc độ pH và thời gian được phát triển để tối ưu hóa sự phân phối được chất đến hồi tràng và suốt kết tràng. ENTOCORT EC[®] được phê chuẩn ở Mỹ để điều trị bệnh Crohn mức độ nhẹ đến trung bình liên quan đến hồi tràng và/hoặc kết tràng lên. Liều dùng qua đường miệng thông thường của ENTOCORT EC[®] để điều trị bệnh Crohn nằm trong khoảng từ 6mg/ngày đến 9mg/ngày. ENTOCORT EC[®] được giải phóng trong ruột trước khi được hấp thu và giữ trong niêm mạc ruột. Ngay khi nó đi qua niêm mạc ruột hướng đích mô, ENTOCORT EC[®] được chuyển hóa rộng bởi hệ cytochrom P450 trong gan thành các chất chuyển hóa có hoạt tính glucocorticoid không đáng kể. Do đó, sinh khả dụng là thấp (khoảng 10%). Sinh khả dụng của budesonide thấp dẫn đến cải thiện tỷ lệ điều trị so với các glucocorticoid khác có chuyển hóa lần đầu qua gan ít rộng hơn. Budesonide dẫn đến ít tác dụng bất lợi hơn, bao gồm ít ức chế vùng dưới đồi-tuyến yên hơn, so với các corticosteroid tác động toàn thân. Tuy nhiên, việc sử dụng ENTOCORT EC[®] lâu dài có thể gây ra tác dụng glucocorticoid toàn thân như chứng tăng năng vỏ thượng thận và ức chế tuyến thượng thận. Xem PDR 58th ed. 2004; 608-610.

Theo các phương án khác, việc kết hợp phong bế LAG-3 và CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 (*tức là*, các dược chất kháng thể kích thích sinh miễn dịch kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1) kết hợp với steroid không hấp thu được có thể được kết hợp thêm với salixylat. Các salixylat bao gồm các chất 5-ASA, ví dụ: sulfasalazine (AZULFIDINE[®], Pharmacia & UpJohn); olsalazine (DIPENTUM[®], Pharmacia & UpJohn); balsalazide (COLAZAL[®], Salix Pharmaceuticals, Inc.); và mesalamine (ASACOL[®], Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA[®], Shire US; CANASA[®], Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA[®], Solvay).

Theo các phương pháp theo sáng chế, salixylat được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1 và steroid không hấp thu được có thể bao gồm việc sử dụng

salixylat và steroid không hấp thu được chồng chéo hoặc lần lượt bất kỳ nhằm mục đích làm giảm tỷ lệ mắc bệnh viêm ruột kết gây ra bởi các kháng thể kích thích sinh miễn dịch. Do đó, ví dụ phương pháp làm giảm tỷ lệ mắc bệnh viêm ruột kết gây ra bởi kháng thể kích thích sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm bước dùng salixylat và steroid không hấp thu được đồng thời hoặc lần lượt (ví dụ, salixylat được sử dụng 6 giờ sau steroid không hấp thu được), hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Ngoài ra, theo sáng chế, salixylat và steroid không hấp thu được có thể được sử dụng qua cùng một đường (ví dụ, cả hai được sử dụng qua đường miệng) hoặc qua các đường khác nhau (ví dụ, salixylat được sử dụng qua đường miệng và steroid không hấp thu được được sử dụng qua trực tràng), các đường này có thể khác với (các) đường đưa thuốc kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1.

Sáng chế còn được minh họa bằng các ví dụ sau, các ví dụ này không được hiểu là giới hạn sáng chế. Nội dung của toàn bộ các hình vẽ và toàn bộ các tài liệu tham khảo, các trình tự Ngân hàng gen, các patent và các đơn yêu cầu cấp patent đã công bố được trích dẫn suốt bản mô tả này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Đặc biệt là, bộc lộ của WO09/045957, WO09/073533, WO09/073546, và WO09/054863 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thiết kế các biến thể của LAG3.1 (kháng thể 25F7)

Các biến thể kháng thể của kháng thể kháng LAG-3, 25F7, được mô tả trên đây, được gọi trong bản mô tả này là LAG3.1, được tạo ra bằng cách thứ nhất phân tích trình tự axit amin của kháng thể đối với các vị trí phân hủy tiềm tàng. Việc biểu hiện gây đột biến định hướng vị trí của vùng V_H của LAG3.1 được thực hiện bằng cách sử dụng kit gây đột biến định hướng vị trí QuikChange II XL® (Agilent Technologies). Sau đó, các vùng V_H thay đổi được phân tách dòng phụ vào vector UCOE® (EMD Millipore) chứa vùng hằng định IgG4-S228P của người. Mỗi vector khác nhau của chuỗi nặng được đồng chuyển nạp bằng vector biểu hiện chuỗi kappa LAG3.1 vào các tế bào CHO-S, và các khu vực ổn định được chọn để biểu hiện

Năm cấu trúc khử amit tiềm năng được nhận diện trong vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2. Các vị trí này nằm ở các vị trí 52, 54, 56, 58, và 60 của vùng biến đổi chuỗi nặng

của LAG3.1 (SEQ ID NO.2) (xem Fig.1A). Đặc biệt là, việc khử amit của trình tự “NG” trong VH CDR2 (SEQ ID NO.6) được quan sát dưới toàn bộ các điều kiện, cũng như việc đồng phân hóa tiếp trình tự. Mức độ khử amit của nguyên liệu ban đầu là khoảng 10%. Ngoài ra, đã phát hiện thấy rằng trình tự “NG” này không tương ứng với trình tự dòng mầm (xem Fig.3). Tuy nhiên, trình tự dòng mầm liên ứng là vị trí glycosyl hóa tiềm năng và, do đó, không được bao gồm trong các kháng thể biến thể.

Bốn biến thể (được gọi trong bản mô tả này là LAG3.5, LAG3.6, LAG3.7, và LAG3.8) được thiết kế nhằm hai trong số các cấu trúc khử amit tiềm năng (các vị trí 54 và 56), như được thể hiện trên Fig.3. Các biến thể này được đưa vào một ma trận các điều kiện như được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây và các đặc điểm sau được phân tích: (a) độ ổn định hóa học và nhiệt (độ ổn định vật lý); (b) sắc ký loại cỡ (hiện tượng kết tập); (c) gel điện di tập trung đẳng điện (Isoelectric Focusing - IEF) (không đồng nhất về điện tích); (d) hoạt tính bằng phân tích Biacore (hoạt tính gắn kết và hoạt tính chức năng); và (e) lập bản đồ peptit bằng phương pháp khối phổ (các biến đổi hóa học/độ ổn định phân tử).

Bảng 1

Dung dịch đậm	Axetat (100nM NaCl, 3%% khối lượng/thể tích manitol, 0,03% Tween-20)	Xitrat (100nM NaCl, 3%% khối lượng/thể tích manitol, 0,03% Tween-20)
Độ pH	5,5, 6,0, 6,5, 7,0	5,5, 6,0, 6,5, 7,0
Nhiệt độ	4°C và 37°C	4°C và 37°C
Thời gian	0, 4, 8, 12 tuần	0, 4, 8, 12 tuần

Ví dụ 2: Mô tả đặc điểm của các biến thể LAG-3

1. Gắn kết tế bào T biểu hiện CD4 của người được hoạt hóa

Để thử nghiệm khả năng của các kháng thể biến thể gắn kết với LAG-3 của người nguyên thể trên bề mặt của tế bào T của người được hoạt hóa, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người cho khỏe mạnh bình thường được kích thích trong các đĩa nuôi cấy mô kích thước 15cm ở mật độ bằng 2×10^6 tế bào/mL, bằng hỗn hợp các kháng thể kháng CD3 (eBioscience, Cat #16-0037-85) và kháng CD28 (BD Bioscience, Cat # 555725) lần lượt có mặt trong dung dịch ở 5 µg/mL và 3 µg/mL. Sau ba ngày kích thích, tế bào được thu nhận, rửa bằng dung dịch đậm PFAE 1x (1x PBS + 2% FBS, 0,02% natri azit, 2mM Na EDTA), và tái tạo huyền phù trong dung dịch đậm PFAE 1x để nhuộm.

Đối với phản ứng gắn kết, pha loãng liên tiếp các biến thể LAG3.1 bằng dung dịch đệm PFAE lạnh 1x, sau đó, trộn 50 μ L dung dịch kháng thể đã pha loãng với 50 μ L kháng CD4 của người được đánh dấu bằng Fitc (BD Bioscience, Cat # 555346) được pha loãng theo tỷ lệ 1:16 trong dung dịch đệm PFAE 1x. Đối với phản ứng gắn kết, bổ sung 100 μ L hỗn hợp kháng thể đã pha loãng này vào 2×10^5 tế bào và ủ hỗn hợp này ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Sau đó, rửa các tế bào hai lần bằng dung dịch đệm PFAE 1x. Bổ sung dịch pha loãng ở tỷ lệ 1:200 của kháng thể đặc hiệu của dê kháng Fc γ của người được đánh dấu bằng PE (Jackson ImmunoResearch, Cat. # 109-116-170) vào và ủ hỗn hợp này trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C, tiếp theo rửa hai lần bằng dung dịch đệm PFAE lạnh 1x. Sau lần rửa cuối cùng, bổ sung 150 μ L 1x PFAE lạnh vào mỗi dung dịch và tiến hành phân tích việc gắn kết kháng thể bằng miễn dịch dòng tế bào bằng cách sử dụng máy đo dòng tế bào FACSCanto (BD Bioscience).

Các kết quả của phân tích miễn dịch dòng tế bào được tóm tắt trên Fig.4A là đồ thị thể hiện EC₅₀ của kháng thể gắn kết với tế bào T biểu hiện CD4 của người hoạt hóa. Fig.4B là đồ thị thể hiện kháng thể gắn kết với kháng nguyên LAG-3/Fc hòa tan của người bằng BIACORE. Như được thể hiện, các ái lực gắn kết của LAG3.5 và LAG3.8 thấp hơn một chút so với LAG3.1, trong khi các hằng số tốc độ phân ly của chúng cao hơn một chút so với LAG3.1.

2. Độ ổn định vật lý

Độ ổn định nhiệt và việc làm biến tính bằng nhiệt của các biến thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng Microcal VP-DSC. Cụ thể, mỗi biến thể được pha loãng vào PBS (Mediatech cat # 21-040-CV lot # 21040139). Nồng độ cuối của mẫu bằng 250 μ g/mL sau khi pha loãng vào PBS. Mẫu được quét đến nhiệt độ 74°C, làm nguội đến nhiệt độ 25°C, và gia nhiệt lại đến nhiệt độ 74°C. Dung dịch đệm PBS được sử dụng làm đối chứng trắng. Dữ liệu được làm khớp với mô hình phi hai trạng thái và việc làm khớp đường cong được thực hiện bằng phần mềm Origin.

Như được tóm tắt trong Bảng 2 và được thể hiện trên Fig.5, LAG3.5 có nhiệt độ nóng chảy TM2 cao hơn so với LAG3.1, chứng tỏ độ ổn định toàn bộ lớn hơn.

Bảng 2

Kháng thể đơn dòng	Tm1 (°C) Tương ứng với các miền	Tm2 (°C) Tương ứng với các miền
--------------------	------------------------------------	------------------------------------

	CH2 và/hoặc Fab	CH3 và/hoặc Fab
LAG3.1	70,7	75,7
LAG3.5	70,5	76,3
LAG3.6	67,8	70,8
LAG3.7	69,4	73,5
LAG3.8	70,3	75,4

Việc tái gấp cuộn kháng thể sau khi làm biến tính là thước đo ngược của khả năng kết tập trong thời gian dài. Do đó, các biến thể LAG-3 cũng được thử nghiệm và so sánh về khả năng thuận nghịch nhiệt. Cụ thể, các kháng thể được gia nhiệt đến nhiệt độ 74°C và để nguội xuống nhiệt độ phòng trước khi được gia nhiệt trở lại đến nhiệt độ 74°C. Tỷ lệ diện tích dưới đường cong của biểu đồ nhiệt thứ hai so với biểu đồ nhiệt thứ nhất đưa ra đánh giá tính thuận nghịch nhiệt, là thước đo trực tiếp tính thuận nghịch cấu hình riêng.

Như được tóm tắt trong Bảng 3 và được thể hiện trên Fig.6, LAG3.5 có mức độ thuận nghịch nhiệt cao hơn đáng kể so với toàn bộ các biến thể khác. Đáng lưu ý, tỷ lệ phần trăm thuận nghịch của LAG3.5 (47%) là nhiều hơn hai lần so với của LAG3.1 (20%). Tính thuận nghịch nhiệt liên quan mật thiết đến khả năng kết tập trong thời gian dài. Tính thuận nghịch thấp hơn tương ứng với khả năng kết tập cao hơn. Dựa trên quan sát này, LAG3.1 có khả năng biểu hiện mức độ kết tập cao hơn đáng kể theo thời gian so với LAG3.5. Tương tự, toàn bộ các biến thể khác có khả năng biểu hiện mức độ kết tập cao hơn đáng kể theo thời gian so với LAG3.5.

Bảng 3

Kháng thể đơn dòng	Mức độ thuận nghịch nhiệt (%)
LAG3.1	20
LAG3.5	47
LAG3.6	0
LAG3.7	11
LAG3.8	26

3. Hiện tượng kết tập

Các biến thể này còn được thử nghiệm về độ ổn định như là thước đo hiện tượng kết tập protein bằng cách sử dụng HPLC loại cỡ chuẩn (SEC-HPLC) theo quy trình sau: các mẫu kháng thể thử nghiệm được pha loãng đến 1,0mg/mL bằng dung dịch muối đệm phosphat (phosphate buffered saline- PBS) và 10µL được đưa vào HPLC (Waters, mô

hình 2795). Bước phân tách được thực hiện trên cột lọc gel (TOSOH Bioscience, TSKgel G3000 SWxl, 7,8 mm x 300 mm, sản phẩm #08541) bằng cách sử dụng pha động là 0,1M natri phosphat, 0,15M natri clorua, 0,1M natri sulfat, độ pH bằng 7,2. Chất phân tích được phát hiện bằng cách theo dõi độ hấp thụ UV ở bước sóng 280nm, và tỷ lệ phần trăm diện tích pic của kháng thể trong chế phẩm được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Empower. Như được thể hiện trong Bảng 4, LAG3.5 có mức độ kết tập giảm đáng kể so với LAG3.1.

Bảng 4

Kháng thể đơn dòng	IgG monome (% diện tích pic)	IgG kết tập (% diện tích pic)
LAG3.1	90	10
LAG3.5	96	4
LAG3.6	96	4
LAG3.7	95	5
LAG3.8	95	5

Ví dụ 3: Chọn lọc biến thể

Dựa trên các nghiên cứu được mô tả trên đây, kháng thể biến thể LAG3.5 được chọn để phân tích tiếp, xét về mặt độ ổn định vật lý và hóa học của nó được cải thiện đáng kể so với dạng không được cải biến của nó (LAG3.1), đặc biệt là khả năng tái gấp cuộn cấu hình riêng cao của nó (tính thuận nghịch nhiệt). Phân tích này bao gồm phương pháp gồm hai bước là (a) điều kiện lão hóa cấp tốc, (b) tiếp theo là đánh giá độ ổn định theo thời gian thực trong 12 tuần. Cụ thể, LAG3.5 được ủ ở nồng độ 1,0mg/mL, độ pH bằng 8,0, 50mM amoni bicacbonat, trong 5 ngày ở nhiệt độ 40°C. Mức độ biến đổi sau 5 ngày, cũng như hiệu quả hoạt tính và độ ổn định, được phân tích. Sau đó, biến thể LAG3.5 được đem thử nghiệm độ ổn định theo thời gian thực trong PBS trong thời gian 12 tuần và được phân tích tiếp. Kết quả của các nghiên cứu này được mô tả dưới đây.

1. Gắn kết kháng nguyên

Như được thể hiện trên Fig.7 (và Bảng 5), không quan sát thấy sự thay đổi trong việc gắn kết kháng nguyên sau 5 ngày. Cũng như được thể hiện trên Fig.10 A và B, LAG3.5 biểu hiện không có sự thay đổi trong việc gắn kết kháng nguyên hay độ ổn định vật lý sau 12 tuần. Đặc biệt là, LAG3.5 duy trì được ái lực cao hơn so với LAG3.8 trong toàn bộ khoảng thời gian 12 tuần ở cả hai nhiệt độ 4°C và 40°C.

Bảng 5

ID dòng vô tính	Kháng nguyên	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$k_{on} \times 10^4$ (1/Mgiây)	$K_{off} \times 10^{-4}$ (1/giây)
Lag3.1	PBS	0,21	166	3,44
	pH8	0,20	184	3,61
Lag3.5	PBS	0,25	130	3,22
	pH8	0,20	148	2,98
Lag3.8	PBS	0,25	147	3,68
	pH8	0,25	162	4,02

2. Biến đổi hóa học/độ ổn định phân tử

Việc lập bản đồ peptit bằng phương pháp khối phổ được sử dụng để phân tích độ ổn định hóa học/phân tử của LAG3.5 so với LAG3.1. Cụ thể, kháng thể tinh chế được khử, alkyl hóa, thẩm tách, và phân cắt bằng trypsin (Promega Cat. V5111) và GluC (Roche Cat. 11047817001). Các mảnh phân cắt được phân tích bằng phương pháp khối phổ nano-LC MSMS (Thermo Fisher LTQ Orbitrap).

Như được thể hiện trên Fig.8, LAG3.1 có mức độ không đồng nhất ở V_H tăng so với LAG3.5 khi đưa vào thử nghiệm độ ổn định gia tốc ở độ pH cao hơn, khử amit các gốc asparagin (bước 1). Sự thay đổi về khối lượng do sự đồng phân hóa không phát hiện được dưới các điều kiện thử nghiệm hiện tại. Tỷ lệ phần trăm thay đổi được biểu thị dưới dạng tỷ lệ của toàn bộ các thay đổi được gộp lại so với pic gốc.

Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.11, LAG3.1 có mức độ không đồng nhất ở V_H tăng so với LAG3.5 khi được đưa vào thử nghiệm độ ổn định theo thời gian thực kéo dài trong 12 tuần, ở cả hai nhiệt độ 4°C và 40°C (bước 2).

3. Độ ổn định vật lý

Mức độ thuận nghịch nhiệt được đo trong PBS và ở độ pH bằng 8,0. Dưới cả hai điều kiện, LAG3.5 cũng thể hiện mức độ tái gấp cuộn gấp khoảng hai lần so với LAG3.1. Cụ thể, như được thể hiện trong các bảng 6-8, LAG3.5 có tỷ lệ tái gấp cuộn là 43% so với LAG3.1 là 18% trong PBS. LAG3.5 cũng có tỷ lệ tái gấp cuộn là 48% so với tỷ lệ tái gấp cuộn của LAG3.1 là 29% ở độ pH bằng 8,0.

Bảng 6 - DSC: nóng chảy

Kháng thể đơn dòng	Điều kiện	Tm1	Tm2
Lag3.1	PBS	70,7	75,7
Lag3.1	pH8	70,4	75,6
Lag3.5	PBS	70,8	76,4
Lag3.5	pH8	70,5	76,3

Bảng 7 - Fluorolog-2: duỗi mạch

Kháng thể đơn dòng /thể đột biến	Trung điểm (M)	Kết tập (M)
Lag3.1 PBS	1,99	-
Lag3.1 pH8	2,08	-
Lag3.5 PBS	1,86	-
Lag3.5 pH8	2,00	-

Bảng 8: DSC: tái gấp cuộn

Kháng thể đơn dòng	% thuận nghịch PBS	% thuận nghịch pH8
Lag3.1	18	29
Lag3.5	43	48

4. Độ không đồng đều điện tích

Để đánh giá độ không đồng đều điện tích, các biến thể được phân tích bằng cách sử dụng điện di tập trung đẳng điện (isoelectrofocusing - IEF) với các chất đánh dấu chuẩn có pI 5,5 và pI 10,0 so với LAG3.1. Nói ngắn gọn, dung dịch kháng thể được đưa lên trên gel IEF pI 3-7 được chế tạo trước có độ dày 1 mm (Invitrogen, Cat# EC6648BOX) cùng với các chất đánh dấu pI 3-10 (SERVA, Cat# 39212). Việc điện di được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm catốt IEF 3-7 (Invitrogen, Cat# LC5370) và dung dịch đệm anốt IEF (Invitrogen, Cat# LC5300) và đưa dòng điện vào ở mức không đổi là 100 V trong 1 giờ, mức không đổi 200 V trong 1 giờ, và mức không đổi 500 V trong 30 phút. Các gel IEF được nhuộm bằng xanh Coomassie để phát hiện các dải protein và làm mất màu bằng dung dịch metanol-axit axetic. Sau đó, các gel IEF được phân tích bằng phần mềm ImageQuant TL. Dựa trên phân tích này (số liệu không được chỉ ra), LAG3.5 có mức độ không đồng nhất ít hơn đáng kể so với LAG3.1.

5. HIC-HPLC

Để đánh giá độ tan, các biến thể này được phân tích bằng sắc ký tương tác kỵ nước (Hydrophobic Interaction Chromatography - HIC) (HIC-HPLC) chuẩn theo quy trình sau: Bổ sung 50µL amoni sulfat 2M vào 50µL mẫu kháng thể thử nghiệm ở nồng độ 1mg/mL. Sau đó, 80µL mẫu thử nghiệm này được đưa vào HPLC (Waters, mô hình 2795) được nối nối tiếp với cột HIC (TOSOH Bioscience, Ether-5PW TSK-gel, 7,5 mm x 75 mm, sản phẩm #07573). Mẫu này được rửa giải ở tốc độ dòng bằng 1,0 ml/phút với gradient là 100% dung dịch đệm A (amoni sulfat 2M, natri phosphat 0,1M, độ pH bằng 7,0) đến 100% dung dịch đệm B (natri phosphat 0,1M, độ pH bằng 7,0) trong 50 phút. Kháng thể

này được phát hiện bằng cách theo dõi độ hấp thụ UV ở 280nm và dữ liệu được phân tích bằng phần mềm Empower. Như được thể hiện trên Fig.9, tính thân nước của LAG3.5 thể hiện độ tan ở nồng độ amoni sulfat cao.

Ví dụ 4: Đảo ngược việc ức chế đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T

Hoạt tính của LAG3.5 được xác định bằng thử nghiệm chức năng dùng tế bào T lai của chuột đặc hiệu kháng nguyên (3A9). Tế bào lai 3A9 có thụ thể tế bào T đặc hiệu với peptit từ lysozym trứng gà (HEL48-62) và tiết IL-2 khi được đồng nuôi cấy với tế bào trình diện kháng nguyên được tạo xung bằng peptit, được làm tương thích bằng MHC (LK35.2). Do huLAG-3-Fc có khả năng gắn kết với dòng tế bào B của chuột dương tính với MHC nhóm II, nên việc biểu hiện huLAG-3 trong dòng 3A9 có thể gây ra tác dụng ức chế qua việc gắn kết với nhóm II trên dòng biểu hiện của chuột. So sánh kiểu đáp ứng peptit của 3A9 bố mẹ với của tế bào 3A9 được tải nạp bằng LAG-3 của người được đồng nuôi cấy với các tế bào trình diện kháng nguyên được làm tương thích MHC cho thấy rằng việc biểu hiện LAG-3 của người ức chế đáp ứng peptit so với tế bào 3A9 đối chứng. Việc ức chế này được đảo ngược bằng cách phong bế LAG-3 bằng LAG3.5. Do đó, việc phong bế sự ức chế qua trung gian LAG-3 được thể hiện đối với LAG3.5.

Ví dụ 5: Hoạt hóa tế bào T bằng LAG3.5

Hoạt tính chức năng của LAG3.5 trên các tế bào T sơ cấp được đánh giá bằng cách sử dụng người

Môi trường nuôi cấy PBMC (Peripheral blood mononuclear cell - tế bào đơn nhân máu ngoại vi) được kích thích bằng siêu kháng nguyên SEB. Toàn bộ PBMC được phân lập từ máu của mười tám người cho và được kích thích trong 72 giờ theo một trong hai dạng thử nghiệm: (i) một lượng cố định kháng thể (20 μ g/mL) và các dịch SEB được pha loãng theo chuỗi, hoặc (ii) một lượng cố định SEB (85 ng/mL) và các dịch kháng thể được pha loãng theo chuỗi.

IL-2 tiết ra, là thước đo hoạt tính của tế bào T, được theo dõi bằng ELISA. Kháng thể kháng PD-1 và Ipilimumab được sử dụng làm các đối chứng dương tính và hoạt tính của LAG3.5 kết hợp với kháng PD-1 hoặc kháng CTLA-4 cũng được đánh giá đối với một nhóm người cho.

Quan sát thấy việc tăng tiết IL-2 trong một khoảng nồng độ SEB từ mười lăm trong số mười tám người cho được điều trị bằng LAG3.5 đơn lẻ, so với việc điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp.

Trong hầu hết các trường hợp, mức độ kích thích là nhỏ hơn so với mức độ quan sát được đối với việc điều trị bằng kháng PD-1 hoặc Ipilimumab. Đối với LAG3.5, các kết quả của hai dạng thử nghiệm (được mô tả trên đây) là phù hợp với nhau. Ngoài ra, ở 5 trong số 6 người cho được thử nghiệm, việc kết hợp LAG3.5 với kháng PD-1 hoặc Ipilimumab gây ra mức độ kích thích cao hơn so với mức độ quan sát được đối với kháng thể đối chứng isotyp được kết hợp với kháng PD-1 hoặc Ipilimumab. Dữ liệu này phát hiện ra rằng LAG3.5 có thể có chức năng trong thử nghiệm tế bào T của người bình thường và có thể còn hoạt hóa các đáp ứng qua trung gian nhờ ức chế chức năng PD-1 và CTLA-4.

Tóm tắt danh mục trình tự

SEQ ID NO.	Mô tả	Trình tự
1	V _H n.a. 25F7 (LAG3.1)	

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VH1_NT

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAG
ACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGATTACTACTG
GAACTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAAT
CAATCATAATGGAAACACCAACTCCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACC
CTATCACTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGA
CCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGTTTGGATATAGTGACTACGA
GTACAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

2	V _H a.a. 25F7	
---	--------------------------	--

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VH1_AA

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIG
EINHNGNTNSNPSLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYE
YNWFDPWGQGTLVTVSS

3	V _K n.a. 25F7	
---	--------------------------	--

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VK1_NT

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
 AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTACTTAGC
 CTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA
 TCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA
 CAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTAT
 TACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAACC
 TGGAGATCAAA

4	V _K a.a. 25F7	
---	--------------------------	--

>1408_LAG-3_403_25F7.1_VK1_AA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
 NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIK

5	V _H CDR1 a.a. 25F7	DYYWN
6	V _H CDR2 a.a. 25F7	EINHNGNTNSNPSLKS
7	V _H CDR3 a.a. 25F7	GYSDYEYNWFDP
8	V _K CDR1 a.a. 25F7	RASQSISSYLA
9	V _K CDR2 a.a. 25F7	DASNRAT
10	V _K CDR3 a.a. 25F7	QQRSNWPLT
11	V _H n.a. LAG3.5	

V_H n.a. LAG3.5

caggtgcagctacagcagtgggcgagcagtggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctatggt
 gggctcctcagtgattactactggaactggatccgccagccccaggggaaggggctggagtggattggggaatcaatcatcgt
 ggaagcaccaactccaaccgctccctcaagagtcgagtcaccctatcactagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctg
 aggtctgtgaccgccgcggacacggctgtgtattactgtgcgtttggatatagtgactacgagtacaactggttcgaccctggg
 gccaggggaaccctgggtaccgtctctca

12	V _H a.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_H a.a. LAG3.5

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIG
 E

INHRGSTNSNPSLKS RVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYS
 DYEYNWFDPWGQGTLVTVSS

13	V _K n.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_K n.a. LAG3.5

gaaattgtgtgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtc
 agagtattagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcaccaacagggc
 cactggcatcccagccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattt
 gcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctctcacttttggccaggggaccaacctggagatcaaa

14	V _K a.a. LAG3.5	
----	----------------------------	--

V_K a.a. LAG3.5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
 ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ
 GTNLEIK

15	V _H CDR1 a.a. LAG3.5	DYYWN
16	V _H CDR2 a.a. LAG3.5	EINHRGSTNSNPSLKS
17	V _H CDR3 a.a. LAG3.5	GYSDYEYNWFD
18	V _K CDR1 a.a. LAG3.5	RASQSISSYLA
19	V _K CDR2 a.a. LAG3.5	DASNRAT
20	V _K CDR3 a.a. LAG3.5	QQRSNWPLT
21	LAG-3 epitop	PGHPLAPG
22	LAG-3 epitop	HPAAPSSW
23	LAG-3 epitop	PAAPSSWG
24	V _H CDR2 a.a. LAG3.6	EIIHSGSTNSNPSLKS
25	V _H CDR2 a.a. LAG3.7	EINHGGGTNSNPSLKS
26	V _H CDR2 a.a. LAG3.8	EINHIGTNSNPSLKS
27	V _H CDR2 a.a. người dòng mầm	GEINHSGSTNY
28		(Gly ₄ -Ser) ₃
29	LAG-3 của người a.a.	

Trình tự LAG-3 của người a.a.

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPL
 QDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVLSV
 GPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRA
 LSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRV
 PVRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTP
 LTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLE
 DVSQAQAGTYTCHIHLEQQNLATVTLAIITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVTPVSGQ
 ERFVWSSLDTPSQRFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAADVFTELS
 SPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFTLGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFS
 LEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL*

30	V _H CDR2 a.a. LAG3.2	VIWYDGSNKYYADSVKG
31	V _H LAG3.1 n.a.	

LAG3.1HC

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAG
 ACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGATTACTACTG
 GAACTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAAT
 CAATCATAATGGAAACACCAACTCCAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACC
 CTATCACTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGA
 CCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGTTTGGATATAGTGACTACGA
 GTACAACCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
 GCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
 CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
 ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
 TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC
 CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC
 AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCC
 CCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCT
 GTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACT
 GGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
 AGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
 GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCT
 CCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG
 CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
 TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGT
 GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG
 AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
 TGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

32	V _H LAG3.1 a.a.	
----	----------------------------	--

Dịch mã của LAG3.1HC

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIG
 EINHNGNTNSNPSLKS RVTLSDTSKNQFSLKLR SVTAADTAVYYCAFGYSDYE

YNWFDPWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
 VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLGLGK*

33	V _L LAG3.1 n.a.	
----	----------------------------	--

LAG3.1LC

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
 AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTACTTAGC
 CTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA
 TCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA
 CAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTAT
 TACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAACC
 TGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
 GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
 GGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
 AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
 GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
 GCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

34	V _L LAG3.1 a.a.	
----	----------------------------	--

Dịch mã của LAG3.1LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDAS
 NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQR SNWPLTFGQG TNLEIKR
 TVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

35	V _H LAG3.5 a.a.	
----	----------------------------	--

Trình tự chuỗi nặng của LAG3.5 - đầy đủ

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIG
 EINHRGSTNSNP SLKSRVTLSLDT SKNQFSLKLR SVTAADTAVYYCAFGYSDY EY
 NWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
 DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLGLGK*

36	V_H LAG3.5 n.a.	
----	-------------------	--

Trình tự chuỗi nặng của LAG3.5 - đầy đủ

caggatgcagctacagcagtggggagcaggactgtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctatggt
 gggatccttcagtgattactactggaactggatccgcagccccaggggaaggggctggagtggttgggaaatcaatcatcgt
 ggaagcaccaactccaacccgtccctcaagagtcgagtcaccctatcactagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctg
 aggtctgtgaccgccgcggacacggctgtgtattactgtgcgttggatatagtgactacgagtacaactggctgacccctggg
 gccaggggaacccctggtcaccgtctcctcagctagcaccaagggcccatcgtcttccccctggcgccctgtccaggagcacc
 tccgagagcacagccgccctgggctgcctggtaaggactactccccgaaccggtagcgtgtcgtggaactcaggcgccct
 gaccagcggtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgcccctcag
 cagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcaaaa
 tatggcccccatgccaccatgccagcacctgagttcctgggggaccatcagttctcgttcccccaaaaccaaggac
 actctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtgggtgggacgtgagccaggaagaccccagggtccagttcaactg
 gtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc
 gtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccat
 cgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggagatgac
 caagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcag
 ccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttctctctctacagcaggctaaccgtggacaa
 gagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgtcctgtagcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctc
 cctgtctctgggtaaatga

37	V_L LAG3.5 a.a.	
----	-------------------	--

Trình tự chuỗi kappa của LAG3.5 - đầy đủ

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
 NRATGIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

38	V _L LAG3.5 n.a.	
----	----------------------------	--

Trình tự chuỗi kappa - LAG3.5 - đầy đủ

gaaattgtgtgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtc
 agagtattagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatcatccaacagggc
 cactggcatcccagccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcacttcaccatcagcagcctagagcctgaagatttt
 gcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctctcacttttggccaggggaccaacctggagatcaaacgtacggtggctg
 caccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatccc
 agagaggccaaagtacagtggaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagc
 aaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaa
 gtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với gen hoạt hóa tế bào lympho-3 của người (LAG-3-lymphocyte activation gene-3), trong đó vùng xác định bổ sung 1 (CDR1-complementarity determining region 1), vùng CDR2, và vùng CDR3 chuỗi nặng chứa các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.16, và SEQ ID NO.17, và vùng CDR1, vùng CDR2, và vùng CDR3 chuỗi nhẹ chứa các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.19, và SEQ ID NO.20.
2. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1 hoặc 3, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14.
3. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này có một hoặc kết hợp các đặc tính sau: (a) gắn kết với LAG-3 của khỉ; (b) không gắn kết với LAG-3 của chuột; (c) ức chế gắn kết của LAG-3 với phân tử tương thích mô chính nhóm II; hoặc (d) kích thích đáp ứng miễn dịch.
4. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này kích thích sản sinh interleukin-2 trong đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên và/hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch kháng khối u.
5. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này gắn kết với LAG-3 của người với hằng số K_D bằng $0,27 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.
6. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể của người.
7. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là isotyp IgG1, isotyp IgG2 hoặc isotyp IgG4.

8. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là isotyp IgG4.
9. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là mảnh kháng thể hoặc kháng thể chuỗi đơn.
10. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này là kháng thể có chiều dài đầy đủ.
11. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 hoặc 10, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng phân lập IgG4 của người có chiều dài đầy đủ gắn kết với LAG-3 của người với hằng số K_D bằng $0,27 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.
12. Phân tử đặc hiệu kép chứa kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, và kháng thể thứ hai hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó.
13. Thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, được liên kết với dược chất.
14. Thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 13, trong đó dược chất này là độc tố gây độc tế bào hoặc đồng vị phóng xạ.
15. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, phân tử đặc hiệu kép theo điểm 12, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 13 hoặc 14, và chất mang dược dụng.
16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó dược phẩm này còn chứa dược chất chống ung thư.
17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó dược chất chống ung thư này là kháng thể hoặc dược chất hóa trị liệu.
18. Dược phẩm theo điểm 17, trong đó kháng thể này là kháng thể có chiều dài đầy đủ.
19. Dược phẩm theo điểm 17 hoặc 18, trong đó kháng thể này là isotyp IgG4.

20. Axit nucleic phân lập mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1 hoặc 2.

21. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 20.

22. Tế bào vật chủ chứa vector biểu hiện theo điểm 21.

23. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng LAG-3 bao gồm bước biểu hiện kháng thể này trong tế bào vật chủ theo điểm 22 và phân lập kháng thể này từ tế bào vật chủ.

LAG3.1 - Kháng-LAG3 25F7 VH

Đoạn V: 4-34
 Đoạn D: 5-12
 Đoạn J: JH5b

```

1      Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
      CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     S L T C A V Y G G S F S D Y Y W N W
      TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GAT TAC TAC TGG AAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    I R Q P P G K G L E W I G E I N H N
      ATC OGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AAT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    G N T N S N P S L K S R V T L S L D
      GGA AAC ACC AAC TCC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC CTA TCA CTA GAC

217    T S K N Q F S L K L R S V T A A D T
      ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                ~~~~~
271    A V Y Y C A F G Y S D Y E Y N W F D
      GCT GTG TAT TAC TGT GCG TTT GGA TAT AGT GAC TAC GAG TAC AAC TGG TTC GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
325    P W G Q G T L V T V S S
      CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Fig.1A

LAG3.1 - Kháng-LAG3 25F7 VK

Đoạn V: L6
Đoạn J: JK2

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

55 A T L S C R A S Q S I S S Y L A W Y
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
CAA CAG AAA OCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

271 R S N W P L T F G Q G T N L E I K
CCT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAC CTG GAG ATC AAA

Fig.1B

LAG3.5 - Kháng-LAG VH

Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L

CDR1

S L T C A V Y G G S F S D Y Y W N W

CDR2

I R Q P P G K G L E W I G E I N H R

CDR2

G S T N S N P S L K S R V T L S L D

T S K N Q F S L K L R S V T A A D T

CDR3

A V Y Y C A F G Y S D Y E Y N W F D

CDR3

P W G Q G T L V T V S S

Fig.2A

LAG3.5 - Kháng-LAG3 VK

Đoạn V: L6
Đoạn J: JK2

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

55 A T L S C R A S Q S I S S Y L A W Y
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AST GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

271 R S N W P L T F G Q G T N L E I K
CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAC CTG GAG ATC AAA

Fig.2B

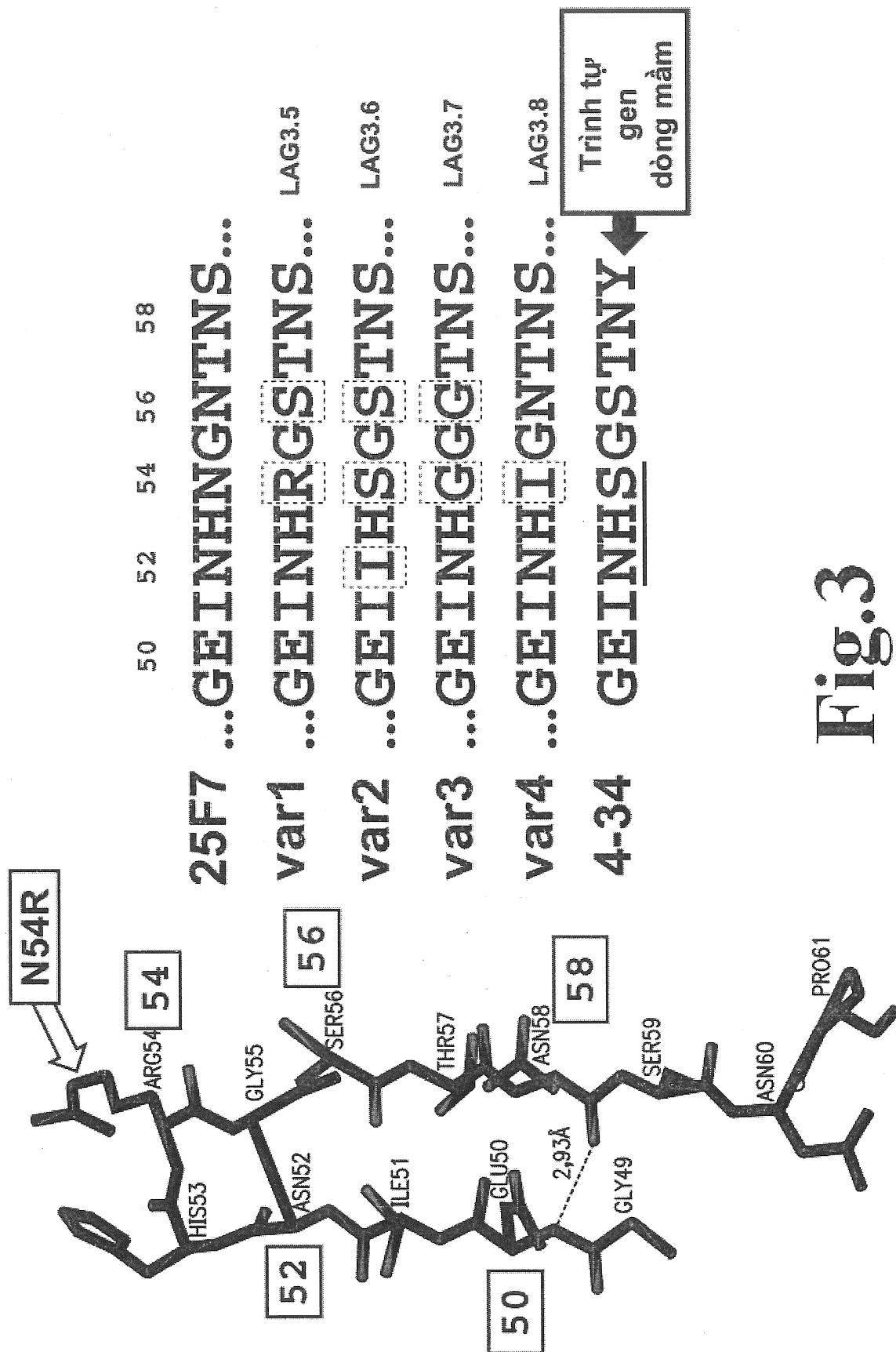


Fig.3

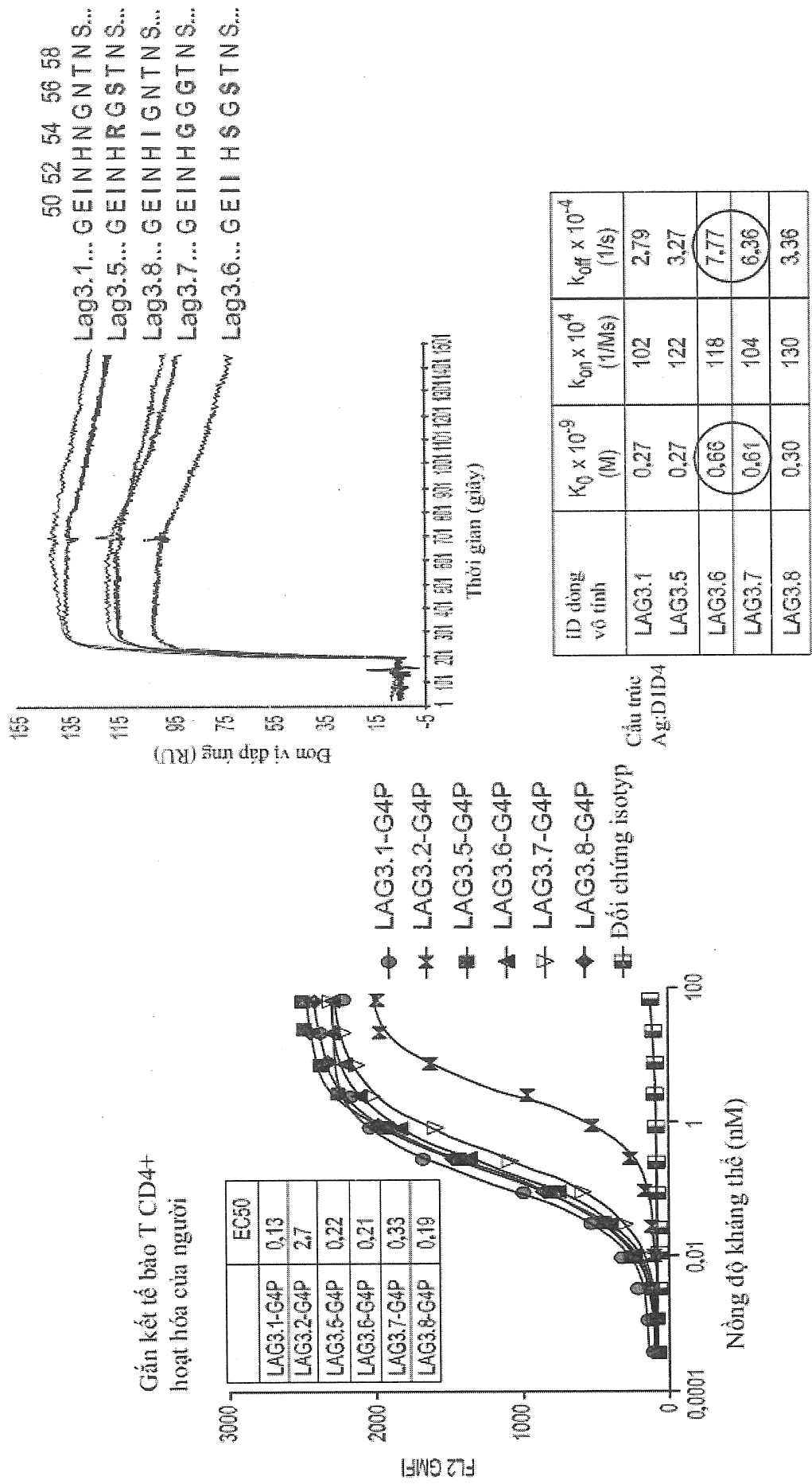
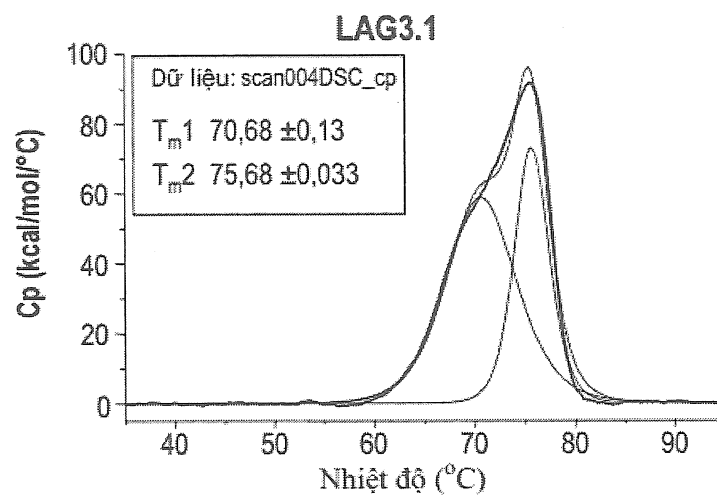
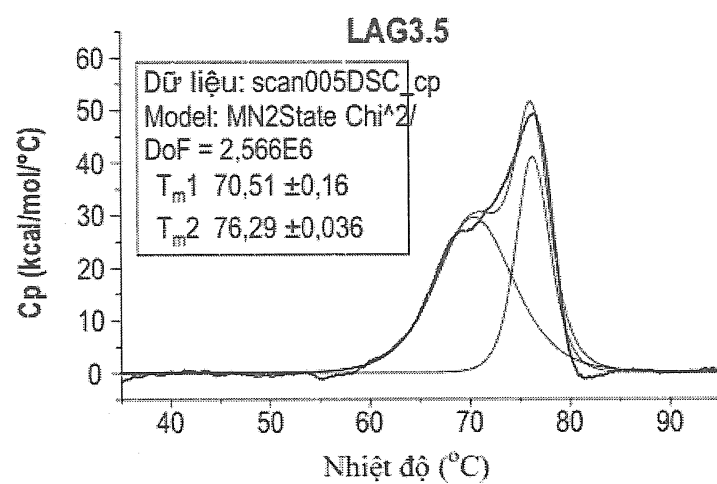
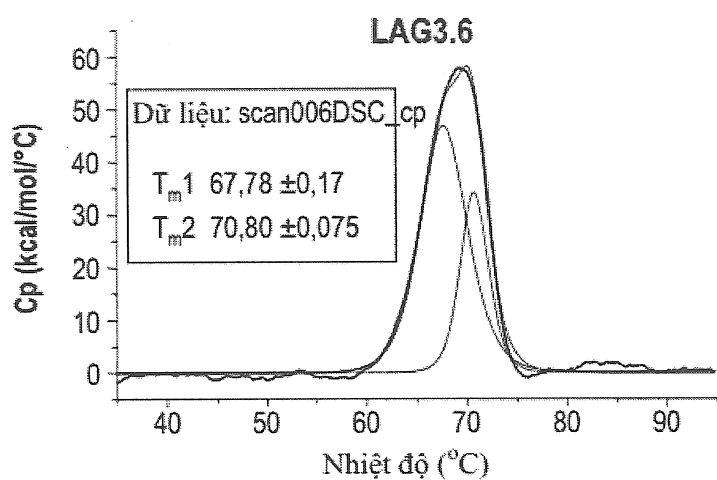
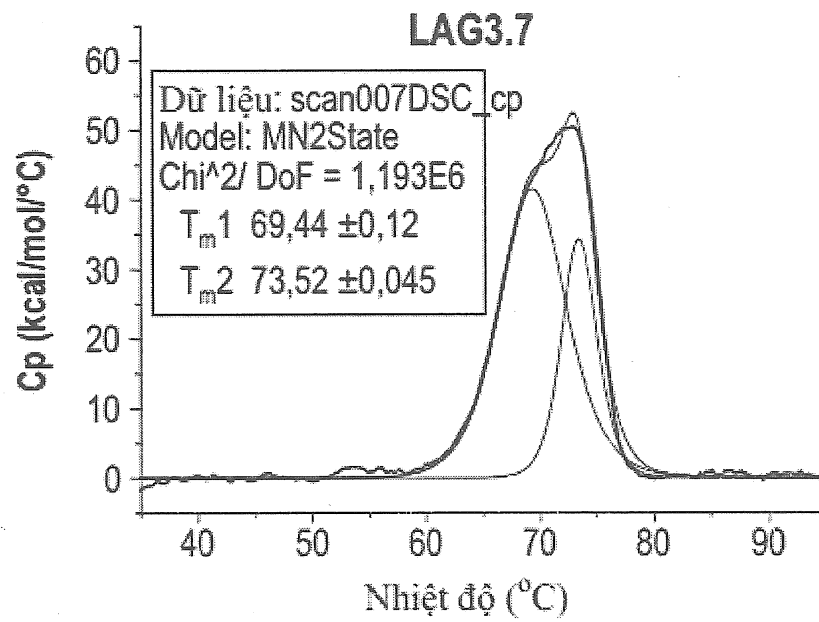
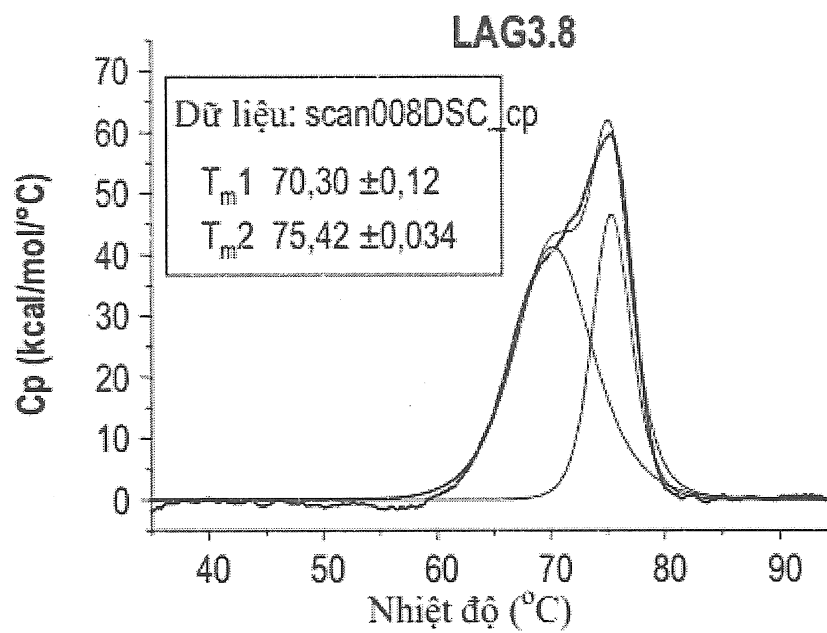
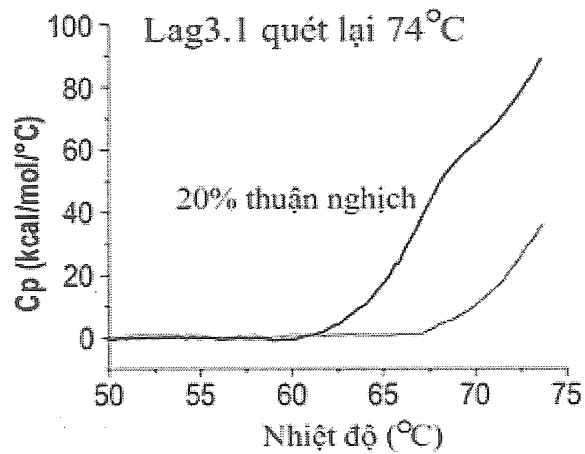
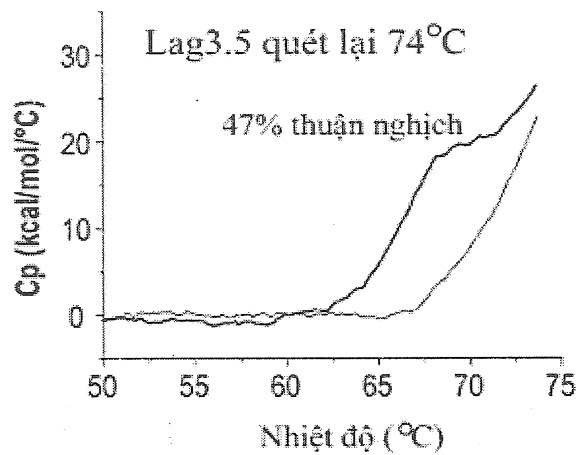
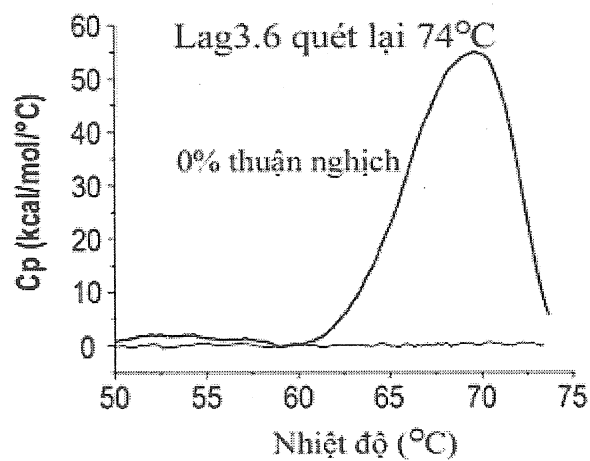


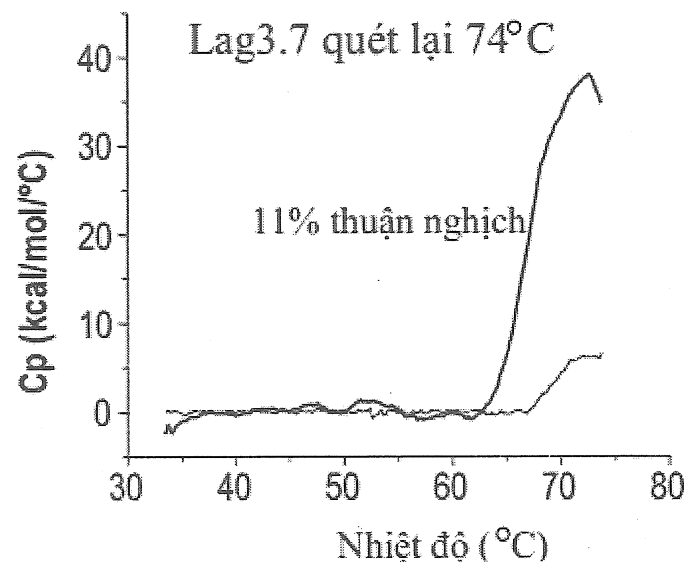
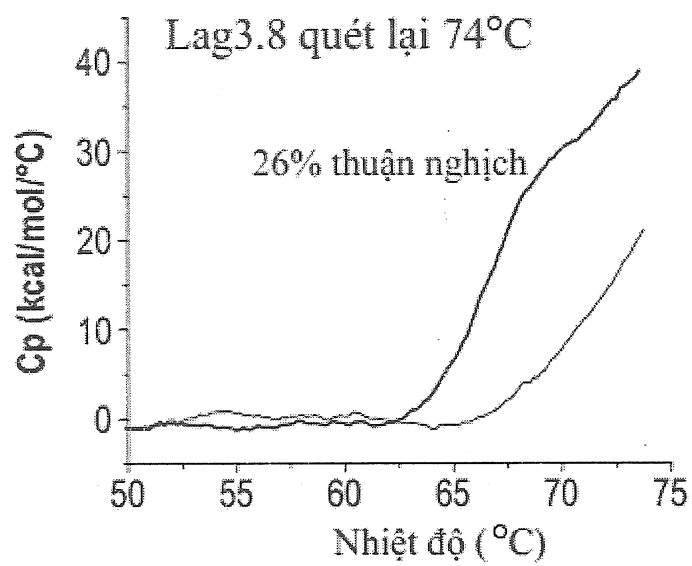
Fig.4B

Fig.4A

**Fig.5A****Fig.5B****Fig.5C**

**Fig.5D****Fig.5E**

**Fig.6A****Fig.6B****Fig.6C**

**Fig.6D****Fig.6E**

Gắn kết tế bào T 4+ của người
Mẫu thử nghiệm độ ổn định tăng cường
được làm tròn chữ số thứ hai

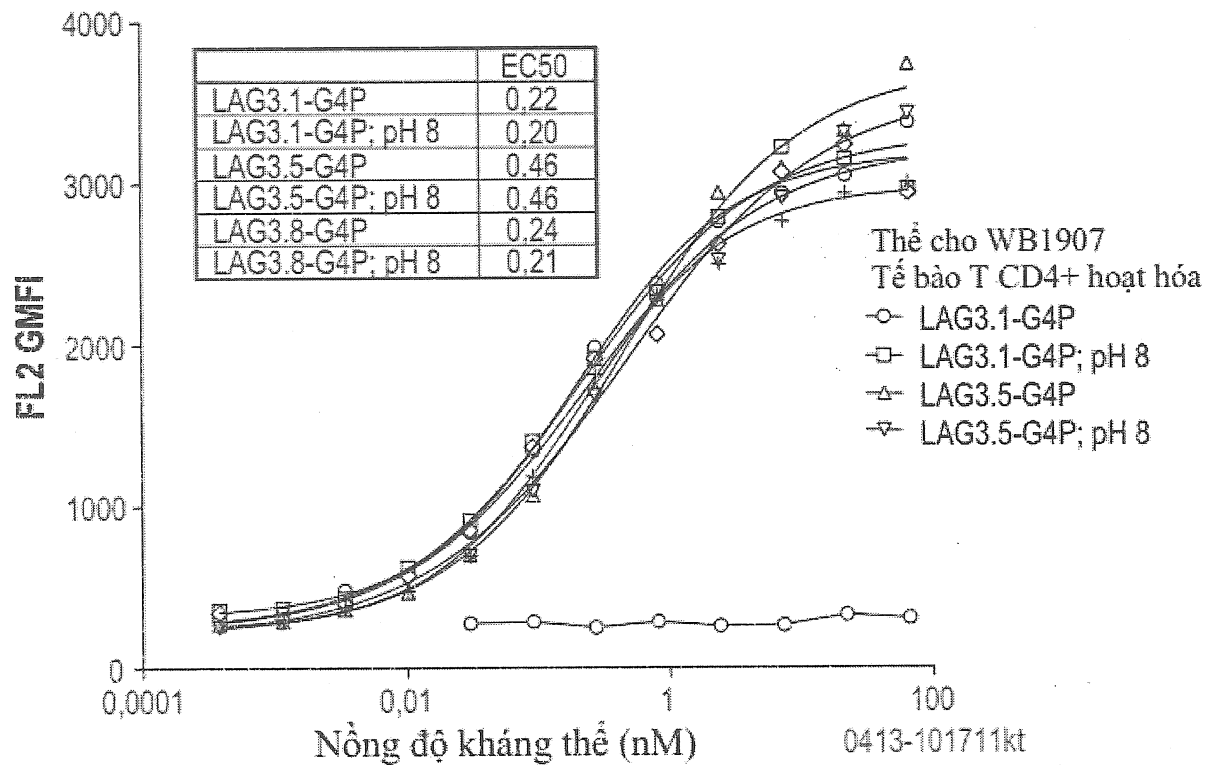


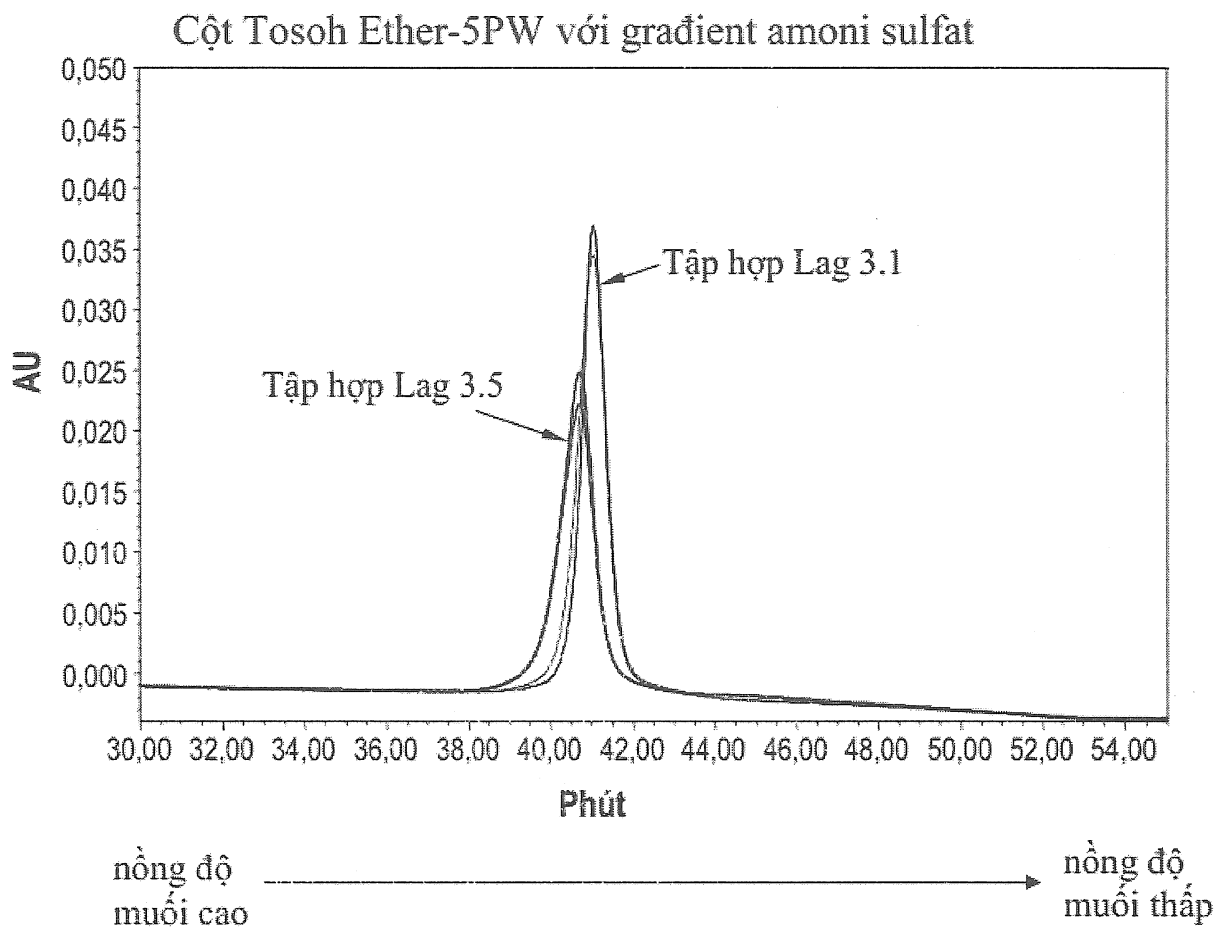
Fig.7

Ủ Mab 5 ngày		Chỉ peptit CDR2 được thể hiện			Tổng số
		INH D*GNTNSNPSLK	INH D GNTNSNPSLK	IDHNGTNSNPSLK	
3,1		2,5%	5,1%	1,5%	9%
3,1 pH8		10,0%	15,3%	4,9%	30%

Khử amit CDR2

		INH RGSTD?SNPSLK	INH RGSTNSNPSLK	ID?HRGSTDSNPSLK	
3,5		2,3%	-	1,5%	4%
3,5 pH8		3,1%	-	1,7%	5%

Fig.8

**Fig.9**

Ái lực

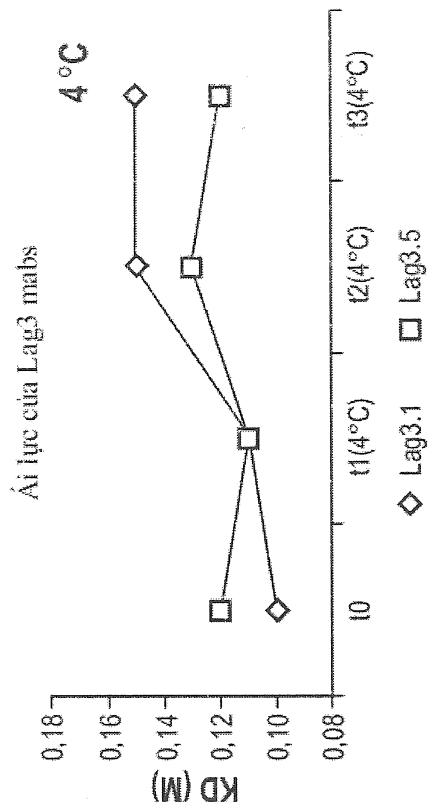


Fig.10A

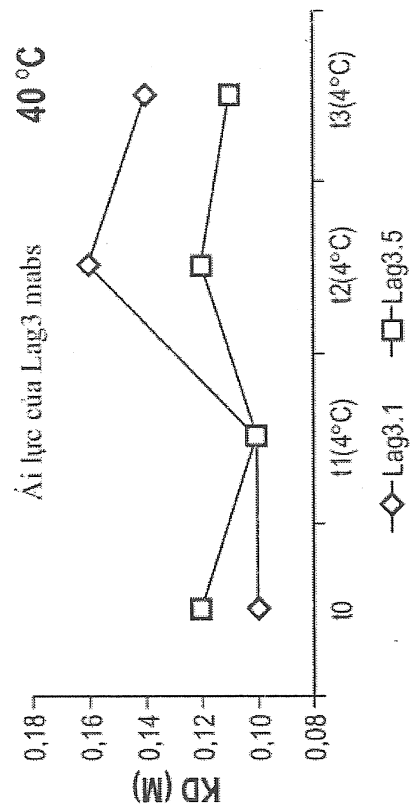


Fig.10B

Độ ổn định vật lý

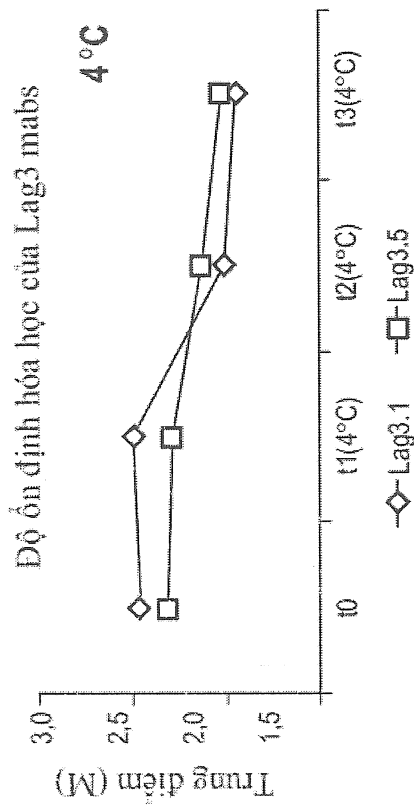


Fig.10C

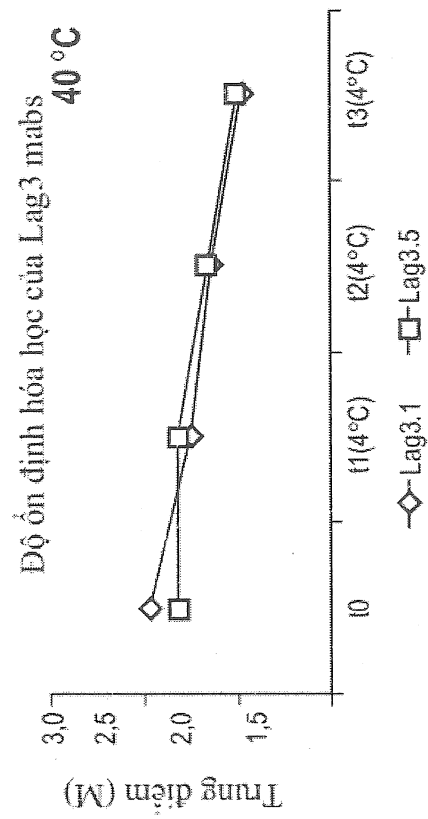
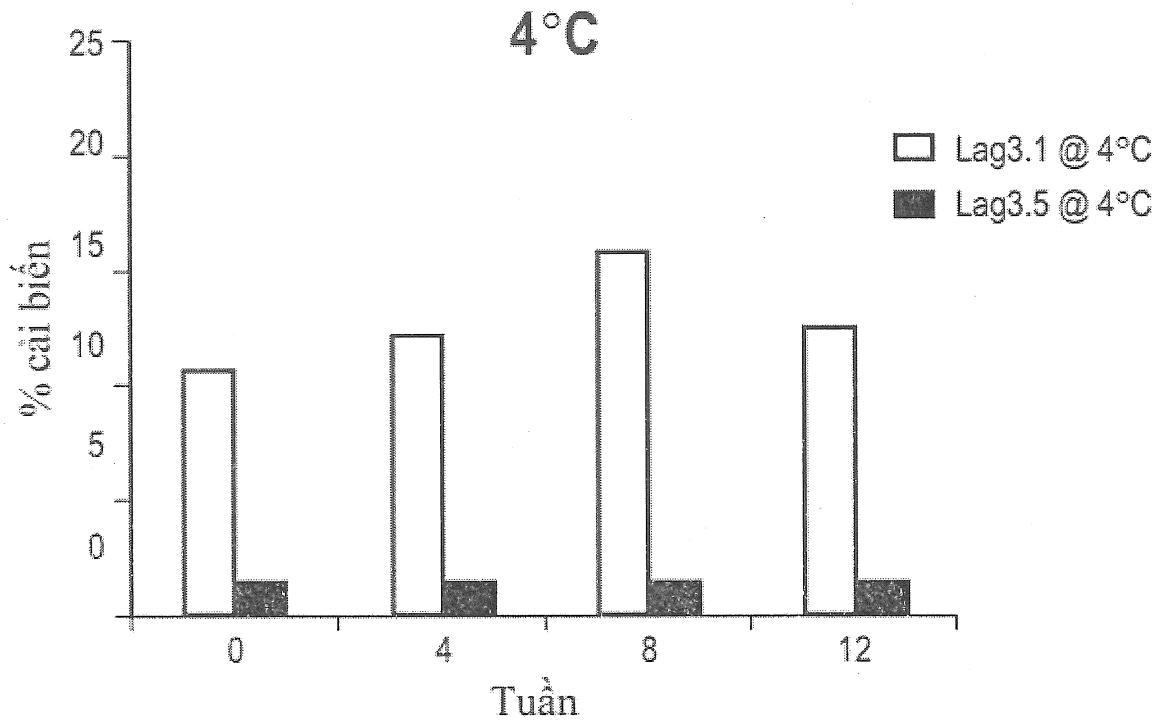
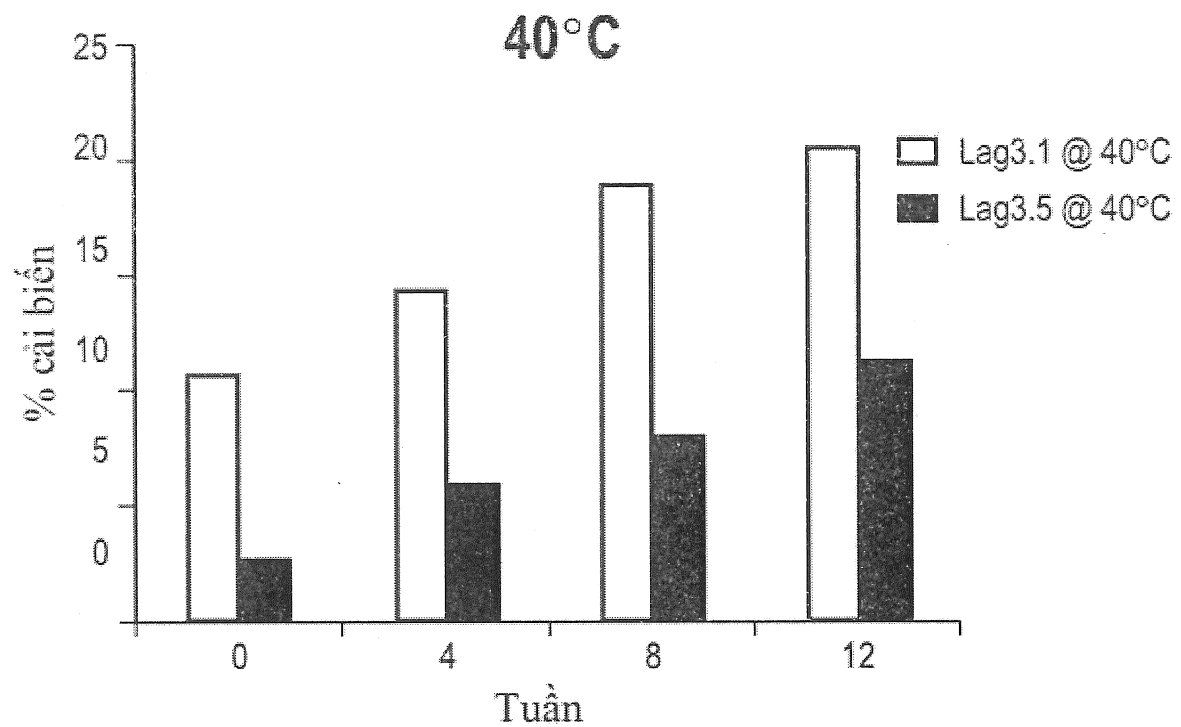


Fig.10D

**Fig.11A****Fig.11B**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DỒNG PHẦN LẬP, DUỐC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

<130> 11911-WO-PCT

<140> PCT/US2013/048999

<141> 2013-07-02

<150> 61/667,058

<151> 2012-07-02

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 1

cag	gtg	cag	cta	cag	cag	tg	ggc	gca	gga	ctg	ttg	aag	cct	tcg	gag	48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	
1			5						10					15		
acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	gct	gtc	tat	ggg	ggg	tcc	ttc	agt	gat	tac	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Asp	Tyr	
			20					25				30				
tac	tg	aac	tg	atc	cgc	cag	ccc	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tg	att	144
Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35				40					45				
ggg	gaa	atc	aat	cat	aat	gga	aac	acc	aac	tcc	aac	cgc	tcc	ctc	aag	192
Gly	Glu	Ile	Asn	His	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	
	50					55					60					
agt	cga	gtc	acc	cta	tca	cta	gac	acg	tcc	aag	aac	cag	ttc	tcc	ctg	240
Ser	Arg	Val	Thr	Leu	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	
	65				70					75			80			
aag	ctg	agg	tct	gtg	acc	gcc	gcg	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	gcg	288
Lys	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85				90					95			
ttt	gga	tat	agt	gac	tac	gag	tac	aac	tg	ttc	gac	ccc	tg	ggc	cag	336
Phe	Gly	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Glu	Tyr	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	
			100				105					110				
gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca									360
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115				120										

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 2

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

<210> 3

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

```

<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)
<400> 3
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20          25          30
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35          40          45
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50          55          60
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65          70          75          80
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85          90          95
act ttt ggc cag ggg acc aac ctg gag atc aaa      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100          105

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 4
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100          105

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 5
Asp Tyr Tyr Trp Asn
1          5

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 6
Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 7
Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
1          5          10

```

```

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 8
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1          5          10
<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 9
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1          5
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 10
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1          5
<210> 11
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"
<400> 11
caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatgggtg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcctc gtggaagcac caactccaac 180
ccgtccctca agagtgcagt caccctatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt 300
gactacgagt acaactgggt cgacccttg ggccaggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360
<210> 12
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 12
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
20          25          30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50          55          60
Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120
<210> 13
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)
<400> 13

```

```

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20         25         30
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35         40         45
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50         55         60
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65         70         75         80
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85         90         95
act ttt ggc cag ggg acc aac ctg gag atc aaa      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100        105

```

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 15

```

Asp Tyr Tyr Trp Asn
1          5

```

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 16

```

Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15

```

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 17

```

Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
1          5          10

```

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

```

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 18
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1          5          10
<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 19
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1          5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 20
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1          5
<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly
1          5
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22
His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
1          5
<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23
Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly
1          5
<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 24
Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15
<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 25
Glu Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15
<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 26
Glu Ile Asn His Ile Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15
<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 27
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn gốc
 <223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
 <400> 28
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 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 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 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 Thr 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
 <210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn gốc
 <223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
 <400> 30
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 31
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn gốc
 <223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"
 <400> 31
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc ctccggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata atggaaacac caactccaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccctatca ctgacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt 300
 gactacgagt acaactggtt cgacccttg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360
 gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 480
 tggaaactcag gcgccttgac cagcggcgctg cacaccttcc cggtgtgctt acagtccctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccttcca gcagcttggg cacgaagacc 600
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660
 aaatatgggt cccatgccc accatgccc gacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720
 ttccctgttc ccccaaaacc caaggacact ccatgatct cccggacccc tgagggtcacg 780
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctgggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc 1200
 gacggctcct ttctctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
 ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344
 <210> 32
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn gốc
 <223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
 <400> 32
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 33

<211> 645

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 33

gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtc	gagtattagc	agctacttag	cctggtagca	acagaaacct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcattcaaca	gggccactgg	catcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	240
gaagattttg	cagttttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctctcac	ttttggccag	300
gggaccaacc	tggagatcaa	acgtacggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtggtc	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	cacctgacg	540
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gttag		645

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 34

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
65 70 75 80	
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu	
85 90 95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 35
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn gốc
 <223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
 <400> 35
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 36
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn gốc
 <223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 36

```

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgccagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggttg gtccttcagt gattactact ggaactggat ccgccagccc 120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatt gtggaagcac caactccaac 180
ccgtccctca agagtcagtg caccctatca ctgacacagt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgtt tggatatagt 300
gactacagtg acaactgggt cgacccctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag caccctccag 420
agcacagccg ccctgggctg cctgttcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcggt cacaccttcc cggtgtcctt acagtccctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gcacctgagt tccctggggg accatcagtc 720
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcattgatc cccggacccc tgaggtcacg 780
tgctgtgttg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagcccagc aacaccaagg agcagttcaa cagcacgtac 900
cgtgtgtgca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaagg cctcccgctc tccatcgaga aaacctctc caaagcctaa 1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
aaccagtgca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctgggag 1140
tgggagagca atgggagacc ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaga agagcaggtg gcaggagggg 1260
aatgtcttct catgtccctg gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

```

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 37

```

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

```

<210> 38

<211> 645

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn gốc

<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 38

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtattagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactcttca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctctcac ttttgccag 300
gggaccaacc tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaa cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

```

```

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 39
Pro Val Gly Val Val
1 5
<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 40
Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro
1 5 10
<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 41
Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser
1 5 10
<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 42
Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser
1 5 10
<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 43
Gly Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Ser
1 5 10
<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 44
Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Ser
1 5 10
<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 45
Gly Glu Ile Asn His Ile Gly Asn Thr Asn Ser
1 5 10
<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<220>
<221> MOD_RES

```

```

<222> (4)..(4)
<223> Gốc được đồng phân hóa
<400> 46
Ile Asn His Asp Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1           5           10
<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 47
Ile Asn His Asp Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1           5           10
<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 48
Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1           5           10
<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 49
Ile Asp His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1           5           10
<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Gốc được đồng phân hóa
<400> 50
Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1           5           10
<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 51
Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1           5           10
<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn gốc
<223> /Lưu ý="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Gốc được đồng phân hóa
<400> 52
Ile Asp His Arg Gly Ser Thr Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys
1           5           10

```