(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) **1-0038798**

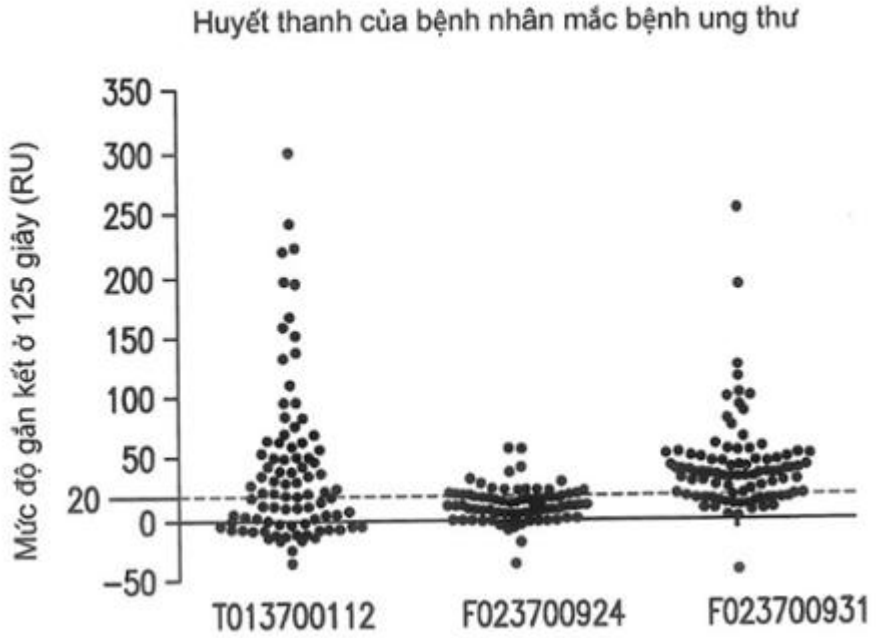
(51)[7] **C07K 16/28**; A61K 45/06; C07K 16/46; A61K 39/395; C07K 16/18

(13) **B**

(21) 1-2018-02327
(22) 17/11/2016
(86) PCT/US2016/062394 17/11/2016
(87) WO 2017/087589 26/05/2017
(30) 62/257,009 18/11/2015 US
(45) 26/02/2024 431
(43) 26/11/2018 368A
(73) Merck Sharp & Dohme LLC (US)
126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065, United States of America
(72) BOWMAN, Edward (US); BEAUMONT, Maribel (FR); BUYSE, Marie-Ange (BE); BOUTTON, Carlo (BE); DOMBRECHT, Bruno (BE); VLERICK, David (BE); KASTELEIN, Robert A. (NL).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẤT GẮN KẾT PD1 VÀ/HOẶC LAG3 VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHẤT GẮN KẾT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất các phân tử, như ISVD và kháng thể nano (kháng thể miền đơn), mà gắn kết với PD1 và LAG3 và, tùy ý với albumin huyết thanh người. Các phân tử này được thiết kế để làm giảm tác động của sự gắn kết bởi các kháng thể đã có trước đó trong cơ thể đối tượng dùng phân tử này. Sáng chế còn liên quan đến các phương pháp để làm tăng đáp ứng miễn dịch, điều trị bệnh ung thư và/hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm bằng các phân tử này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến, một phần, các trình tự axit amin gắn kết với protein gây chết tế bào theo chương trình 1 ("programmed cell death protein 1 - PD1"), ví dụ, PD1 ở người và gen hoạt hóa lympho bào 3 (lymphocyte activation gene 3 - LAG3). Cụ thể, sáng chế đề cập đến, một phần, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch chuỗi nặng được cải thiện (ở đây còn gọi là "ISV" hoặc "ISVD") gắn kết với PD1 và LAG3, cũng như đề cập đến polypeptit và các hợp chất khác chứa ISVD này. Dựa vào phần mô tả ở đây, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ hơn về các khía cạnh, phương án, đặc điểm, cách dùng và ưu điểm khác của sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể chết theo chương trình (Programmed death receptor 1: PD-1) là thụ thể ức chế miễn dịch mà chủ yếu được biểu hiện trên các tế bào T và B đã hoạt hóa. Sự tương tác với các phối tử của nó làm giảm đáp ứng tế bào T cả in vitro và in vivo. Sự phong bế tương tác giữa PD-1 và một trong số các phối tử của nó, PD-L1, làm tăng sự miễn dịch tế bào T $CD8^+$ đặc hiệu khối u, và do đó có thể là hữu dụng trong sự thanh thải tế bào khối u bằng hệ miễn dịch.

PD-1 (được mã hóa bởi gen Pdcd1) là thành phần thuộc liên họ globulin miễn dịch liên quan đến CD28, và CTLA-4. PD-1 thể hiện điều hòa âm tín hiệu thụ thể kháng nguyên khi ăn khớp các phối tử của nó (PD-L1 và/hoặc PD-L2) Cấu trúc PD-1 của chuột đã được giải thích cũng như cấu trúc đồng tinh thể của PD-1 của chuột nhắt với PD-L1 của người (Zhang, X. *et al.*, Immunity 20: 337-347 (2004); Lin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 3011-6 (2008)). PD-1 và các thành phần tương tự trong họ là glycoprotein xuyên màng typ I chứa miền Ig kiểu biến đổi (V-type) có chức năng gắn kết phối tử và đoạn cuối bào tương mà có chức năng gắn kết các phân tử tín hiệu. Phần cuối bào tương của PD-1 chứa hai mẫu (motif) tín hiệu dựa vào tyrosin, ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: motif ức chế dựa vào tyrosin thụ thể miễn dịch) và ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif: motif chuyển đổi dựa vào tyrosin thụ thể miễn dịch).

Sau khi kích thích tế bào T, PD-1 lấy thêm tyrosin phosphataza SHP-2 vào motif ITSM trong phần đuôi bào tương của nó, dẫn đến khử phosphoryl hóa các phân tử tác động như CD3 zeta, PKC theta và ZAP70 mà được bao gồm trong tầng tín hiệu tế bào T CD3. Cơ chế tại đó PD-1 điều biến giảm đáp ứng tế bào T là giống với, nhưng khác về cơ chế của CTLA-4, vì hai phân tử điều hòa bộ protein tín hiệu chồng lắp (Parry *et al.*, Mol. Cell. Biol. 25: 9543-9553 (2005)). Bennett và các đồng tác giả đã cho thấy sự ức chế qua trung gian PD-1 đối với tín hiệu tế bào T chỉ có tác dụng khi cả hai tín hiệu hoạt hóa và ức chế ở trên cùng bề mặt, chỉ ra rằng cơ chế tạo tín hiệu PD-1 được xác định theo không gian-thời gian (Bennett F. *et al.*, J Immunol. 170:711-8 (2003)). PD-1 biểu hiện trên các lympho bào hoạt tính (các tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$ ngoại vi, tế bào B và bạch cầu đơn nhân) và còn biểu hiện trong sự phát triển tuyến ức trên các tế bào T $CD4^-$ $CD8^-$ (âm tính kép) cũng như tế bào T NK.

Các phối tử của PD-1 (PD-L1 và PD-L2) được biểu hiện về cấu trúc hoặc có thể được tạo ra trong nhiều loại tế bào khác nhau, bao gồm các mô không tạo máu cũng như các loại mô khác. PD-L1 được biểu hiện trên các tế bào B, T, tế bào dạng tủy và tế bào đuôi gai (tế bào có tua, dendritic cells - DCs), nhưng cũng trên các tế bào ngoại vi, như các tế bào màng trong vi mạch và các cơ quan không phải lympho như tim, phổi *v.v.*. Ngược lại, PD-L2 chỉ được phát hiện trên đại thực bào và DC. Mẫu biểu hiện của phối tử PD-1 gợi đến vai trò của PD-1 trong việc duy trì dung nạp ngoại vi và có thể dùng để điều hòa đáp ứng tế bào T và B tự phản ứng ở ngoại vi. Cả hai phối tử là các thụ thể xuyên màng typ I chứa cả hai miền giống IgV và IgC trong vùng ngoại bào. Cả hai phối tử chứa các vùng bào tương ngắn với motif tín hiệu chưa biết.

Sự tương tác của PD-1 với các phối tử của nó dẫn đến sự ức chế tăng sinh lympho bào in vitro và in vivo. Sự phá vỡ tương tác PD-1/PD-L1 làm tăng sự tăng sinh tế bào T và sự sản sinh xytokin và phong bế tiến triển của chu trình tế bào. Phân tích ban đầu về $Pdcd1^{-/-}$ của chuột nhắt không nhận diện được phenotyp miễn dịch mạnh bất kỳ. Tuy nhiên, những con chuột già phát triển các bệnh tự miễn tự phát khác về giống trên đó sự thiếu hụt Pdcd1 được lai ngược. Các bệnh này bao gồm chứng viêm khớp tăng sinh giống luput (C57BL/6) (Nishimura H. *et al.*, Int. Immunol. 10: 1563-1572 (1998)), bệnh cơ tim

nghiêm trọng (BALB/c) (Nishimura H. *et al.*, Science 291: 319-322 (2001)) và bệnh đái tháo đường typ I (NOD) (Wang J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11823-11828 (2005)). Nói chung, việc phân tích về các động vật tách gen (bất hoạt gen, knockout) dẫn đến hiểu được các chức năng PD-1 chủ yếu gây và điều hòa dung nạp ngoại vi. Do đó, sự phong bế điều trị của con đường PD-1 có thể là hữu dụng để khắc phục sự dung nạp miễn dịch. Sự phong bế chọn lọc này có thể được sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư hoặc lây nhiễm cũng như tăng tính miễn dịch trong khi chủng ngừa (phòng ngừa hoặc điều trị).

Vai trò của PD-1 ở bệnh ung thư được nêu trong tài liệu chuyên ngành. Đã biết là vi môi trường khối u có thể bảo vệ các tế bào khối u khỏi sự phá hủy miễn dịch hiệu quả. Gần đây, PD-L1 biểu hiện trên một số khối u của chuột nhắt và người (và được cảm ứng bởi IFN gama trên phần lớn các dòng tế bào khối u có PD-L1 âm tính) và được cho là làm trung gian cho sự lẩn tránh miễn dịch (Iwai Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002); Strome S. E. *et al.*, Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003).

Ở người, sự biểu hiện của PD-1 (trên lympho bào xâm nhập khối u) và/hoặc PD-L1 (trên tế bào khối u) được phát hiện ở một số mẫu sinh thiết khối u tiên phát được đánh giá bằng hóa mô miễn dịch. Các mô này bao gồm các bệnh ung thư phổi, gan, buồng trứng, cổ tử cung, da, ruột kết, u thần kinh đệm, bàng quang, vú, thận, thực quản, dạ dày, tế bào vảy ở miệng, tế bào biểu mô đường niệu, và tuyến tụy cũng như các khối u đầu và cổ (Brown J. A. *et al.*, J. Immunol. 170: 1257-1266 (2003); Dong H. *et al.*, Nat. Med. 8: 793-800 (2002); Wintterle *et al.*, Cancer Res. 63: 7462-7467 (2003); Strome S. E. *et al.*, Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003); Thompson R. H. *et al.*, Cancer Res. 66: 3381-5 (2006); Thompson *et al.*, Clin. Cancer Res. 13: 1757-61 (2007); Nomi T. *et al.*, Clin. Cancer Res. 13: 2151-7. (2007)). Đáng chú ý hơn, sự biểu hiện phối tử PD trên các tế bào khối u liên quan đến tiên lượng xấu về các bệnh nhân mắc bệnh ung thư qua nhiều loại khối u (xem tài liệu Okazaki and Honjo, Int. Immunol. 19: 813-824 (2007)).

Sự phong bế tương tác PD-1/PD-L1 có thể dẫn đến tính miễn dịch tế bào T đặc hiệu khối u tăng và do đó hữu dụng trong việc thanh thải các tế bào khối u bởi hệ miễn dịch. Một số nghiên cứu được thực hiện để giải quyết vấn đề này. Ở mẫu chuột mắc bệnh

ung thư tuyến tụy xâm lấn, T. Nomi *et al.* (Clin. Cancer Res. 13: 2151-2157 (2007)) chứng minh hiệu quả điều trị của việc phong bế PD-1/PD-L1. Dùng kháng thể hướng PD-1 hoặc PD-L1 ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Sự phong bế bằng kháng thể có hiệu quả thúc đẩy sự xâm nhập tế bào T $CD8^+$ hoạt tính khối u vào khối u dẫn đến tăng cường điều hòa các chất tác động kháng khối u bao gồm IFN gama, granzyme B và perforin. Ngoài ra, các tác giả chỉ ra rằng sự phong bế PD-1 có thể được kết hợp hiệu quả với hóa học trị liệu (hóa trị) để tạo ra tác dụng hiệp đồng. Trong nghiên cứu khác, sử dụng mẫu caxinom tế bào vảy ở chuột nhắt, sự phong bế bởi kháng thể đối với PD-1 hoặc PD-L1 ức chế đáng kể sự phát triển khối u (Tsushima F. *et al.*, Oral Oncol. 42: 268-274 (2006)).

Trong các nghiên cứu khác, việc chuyển nhiễm dòng u tế bào bón (u dưỡng bào) của chuột với PD-L1 dẫn đến giảm sự phân giải tế bào khối u khi nuôi cấy đồng thời với dòng vô tính CTL đặc hiệu khối u. Sự phân giải này được khôi phục khi mAb kháng PD-L1 được thêm vào (Iwai Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002)). In vivo, sự phong bế tương tác PD1/PD-L1 làm tăng hiệu quả của liệu pháp chuyển tế bào T nhận nuôi trong mẫu khối u ở chuột nhắt (Strome S. E. *et al.*, Cancer Res. 63: 6501-6505 (2003)). Bằng chứng khác về vai trò của PD-1 trong điều trị bệnh ung thư theo thử nghiệm được thực hiện với chuột nhắt bất hoạt gen (knockout) PD-1. Tế bào u tuỷ biểu hiện PD-L1 chỉ phát triển ở động vật kiểu dại (kết quả là phát triển khối u và kết hợp với việc động vật chết), nhưng không phải ở chuột nhắt thiếu hụt PD-1 (Iwai Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002)).

Trong các nghiên cứu ở người, R. M. Wong *et al.* (Int. Immunol. 19: 1223-1234 (2007)) chỉ ra rằng sự phong bế PD-1 sử dụng kháng thể kháng PD-1 đầy đủ của người làm tăng hoàn toàn số tế bào T CD8+ đặc hiệu khối u (CTL) trong thử nghiệm kích thích ex vivo sử dụng kháng nguyên vacxin và các tế bào từ các cá thể đã chủng ngừa. Ở nghiên cứu tương tự, sự phong bế bằng kháng thể đối với PD-L1 dẫn đến gia tăng hoạt tính huỷ tế bào của tế bào T gây độc tế bào đặc hiệu kháng nguyên liên quan đến khối u và tăng sự sản sinh xytokin bởi các tế bào T_H đặc hiệu khối u (Blank C. *et al.*, Int. J. Cancer 119: 317-327 (2006)). Các tác giả chỉ ra rằng sự phong bế PD-L1 làm tăng đáp

ứng tế bào T đặc hiệu khối u in vitro khi sử dụng kết hợp với sự phong bế kháng CTLA-4.

Nói chung, con đường PD-1/PD-L1 là đích được xác nhận là tốt để phát triển liệu pháp kháng thể điều trị bệnh ung thư. Các kháng thể kháng PD-1 cũng có thể là hữu dụng trong lây nhiễm virut mạn tính. Tế bào ghi nhớ T $CD8^+$ sinh ra sau khi nhiễm virut cấp tính là rất hoạt động và tạo thành thành phần quan trọng của sự miễn dịch bảo vệ. Ngược lại, lây nhiễm mạn tính thường được đặc trưng bởi sự thay đổi mức độ suy yếu chức năng (suy kiệt) của đáp ứng tế bào T đặc hiệu virut, và nhược điểm này là lý do chính cho việc không có khả năng của chủ thể để loại bỏ thể sinh bệnh còn dai dẳng. Mặc dù tế bào T tác động chức năng được tạo ra ngay ban đầu trong giai đoạn mới nhiễm, nhưng chúng dần mất chức năng trong suốt thời gian nhiễm mạn tính. Barber *et al.* (Barber *et al.*, Nature 439: 682-687 (2006)) cho thấy chuột nhắt nhiễm chủng LCMV trong phòng thí nghiệm phát triển sự lây nhiễm mạn tính dẫn đến mức virut cao trong máu và các mô khác. Ban đầu, các con chuột nhắt này phát triển đáp ứng tế bào T mạnh, nhưng cuối cùng không chịu nổi sự lây nhiễm khi suy kiệt tế bào T. Các tác giả phát hiện ra rằng sự sụt giảm về số lượng và chức năng của tế bào T tác động ở chuột bị nhiễm mạn tính có thể được đảo ngược bằng cách tiêm kháng thể làm phong bế sự tương tác giữa PD-1 và PD-L1.

Gần đây, đã thấy rằng PD-1 biểu hiện cao ở tế bào T của cá thể nhiễm HIV và sự biểu hiện thụ thể liên quan đến chức năng tế bào T suy yếu và tiến triển bệnh (Day *et al.*, Nature 443:350-4 (2006).; Trautmann L. *et al.*, Nat. Med. 12: 1198-202 (2006)). Ở cả hai nghiên cứu, sự phong bế phối tử PD-L1 làm tăng đáng kể sự phát triển của tế bào sản sinh IFN-gama, đặc hiệu HIV in vitro.

Các nghiên cứu khác còn nói đến tầm quan trọng của con đường PD-1 trong việc kiểm soát lây nhiễm virut. Chuột tách gen PD-1 (knockout) thể hiện sự kiểm soát lây nhiễm adenovirut tốt hơn chuột kiểu dại (Iwai *et al.*, J. Exp. Med. 198:39-50 (2003)). Hơn nữa, việc chuyển tế bào T đặc hiệu HBV nhận nuôi vào động vật chuyển gen HBV là khởi đầu bệnh viêm gan (Isogawa M. *et al.*, Immunity 23:53-63 (2005)). Tình trạng

bệnh của các động vật này dao động là kết quả của sự trình diện kháng nguyên trong gan và tăng cường điều chỉnh PD-1 bằng các tế bào gan.

Ngoài ra, LAG3 (CD223) là phân tử bề mặt tế bào biểu hiện trên tế bào T hoạt tính (Huard *et al*. Immunogenetics 39:213–217, 1994), tế bào NK (Triebel *et al*. J Exp Med 171:1393–1405, 1990), tế bào B (Kisielow *et al*. Eur J Immunol 35:2081–2088, 2005), và tế bào đuôi gai dạng tương bào (Workman *et al*. J Immunol 182:1885–1891, 2009) đóng vai trò quan trọng trong chức năng của các nhóm phụ tế bào lympho. Ngoài ra, sự tương tác giữa LAG3 và phối tử chính của nó, MHC lớp II, được cho là đóng vai trò trong việc điều biến chức năng tế bào đuôi gai (Andreae *et al*. J Immunol 168:3874–3880, 2002). Các nghiên cứu cận lâm sàng gần đây đã đưa ra tài liệu về vai trò của LAG-3 trong tình trạng thay đổi của tế bào T CD8 (Blackburn *et al*. Nat Immunol 10:29–37, 2009).

Đối với việc lây nhiễm virut mạn tính, các tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$ đặc hiệu-kháng nguyên khối u biểu thị chức năng bộ phận tác động suy yếu và phenotyp thay đổi được đặc trưng bởi việc sản sinh xytokin tiền viêm giảm và giảm đáp ứng với việc kích thích lại kháng nguyên. Quá trình này được gián tiếp qua cơ chế tế bào ngoại lai, như tế bào T điều hòa (Treg), và cơ chế bên trong tế bào, như các phân tử ức chế mà được tăng cường điều hòa trên tế bào lympho xâm nhập khối u (tumor-infiltrating lymphocytes - TIL) bị suy kiệt. Cơ chế ức chế này là rào cản tính miễn dịch kháng khối u hiệu quả.

LAG- được biểu hiện trên TIL được điều trị cho thấy chúng góp phần vào việc ức chế miễn dịch qua trung gian khối u. Sự ức chế của LAG3 có thể dẫn đến tăng cường hoạt tính của tế bào T đặc hiệu-kháng nguyên, từ đó có thể đạt được lợi ích điều trị.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) hoặc kháng thể miền đơn (kháng thể nano, nanobody) mà gắn kết với PD1 (ví dụ, PD1 của người) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2; nhưng bao gồm đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và 112 trong đó các vị trí này được đánh số theo Kabat (ví dụ, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L và, tùy ý, E1D; hoặc L11V,A14P,W52aV,N73P,A74S,K83R,I89L,W100a và, tùy ý,

E1D), bao gồm CDR1 chứa trình tự axit amin: IHAMG (SEQ ID NO: 3) hoặc GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); CDR2 chứa trình tự axit amin: VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V) hoặc VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7; trong đó X là W hoặc V); và CDR3 chứa trình tự axit amin: DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F) hoặc DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 8, trong đó X là W hoặc F). Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm gốc axit amin ở vị trí 11 được chọn từ L hoặc V; gốc axit amin ở vị trí 89 được chọn từ T, V hoặc L; gốc axit amin ở vị trí 110 được chọn từ T, K hoặc Q; và/hoặc gốc axit amin ở vị trí 112 được chọn từ S, K hoặc Q. Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm một hoặc nhiều đột biến được mô tả là thành phần được chọn từ nhóm bao gồm: 89T; 89L kết hợp với 11V; 89L kết hợp với 110K hoặc 110Q; 89L kết hợp với 112K hoặc 112Q; 89L kết hợp với 11V và 110K hoặc 110Q; 89L kết hợp với 11V và 112K hoặc 112Q; 11V kết hợp với 110K hoặc 110Q; 11V kết hợp với 112K hoặc 112Q. Theo một phương án của sáng chế, các axit amin ở các vị trí 11, 89, 110 và 112 là các axit amin nêu trong bảng B ở đây (trong bản mô tả này). Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm 1, 14, 41, 74, 83, 87 và 108 và/hoặc một hoặc nhiều sự thay thế nhân hóa đã biết (tham chiếu tình trạng kỹ thuật nêu ở đây, như WO 08/020079 hoặc WO 09/138519. Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm phần kéo dài đầu tận cùng C của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 axit amin. Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm phần kéo dài đầu tận cùng C theo công thức -X(n), trong đó X và n là như sau: (a) n = 1 và X = Ala; (b) n = 2 và mỗi X = Ala; (c) n = 3 và mỗi X = Ala; (d) n = 2 và ít nhất một X = Ala và trong đó (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ; (e) n = 3 và ít nhất một X = Ala và trong đó (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ; (f) n = 3 và ít nhất hai X = Ala và trong đó (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ;

(g) n = 1 và X = Gly; (h) n = 2 và mỗi X = Gly; (i) n = 3 và mỗi X = Gly; (j) n = 2 và ít nhất một X = Gly trong đó (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ; (k) n = 3 và ít nhất một X = Gly trong đó (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ; (l) n = 3 và ít nhất hai X = Gly trong đó (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ; (m) n = 2 và mỗi X = Ala hoặc Gly; (n) n = 3 và mỗi X = Ala hoặc Gly; (o) n = 3 và ít nhất một X = Ala hoặc Gly trong đó (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ; hoặc (p) n = 3 và ít nhất hai X = Ala hoặc Gly trong đó (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ, ví dụ, A, AA, AAA, G, GG, GGG, AG, GA, AAG, AGG, AGA, GGA, GAA hoặc GAG. Sáng chế còn đề xuất chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở vị trí 11, 89, 110 và 112 và trình tự axit amin có ít nhất 85% (ví dụ, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 hoặc 100%) trình tự đồng nhất (giống hệt) với trình tự axit amin nêu trong thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 9-40 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR bất kỳ là không tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự). Sáng chế còn đề xuất globulin miễn dịch đa đặc hiệu chứa chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) mà gắn kết với PD1 liên kết với một hoặc nhiều phân tử mà gắn kết với epitop không phải là epitop mà chất gắn kết PD1 gắn kết (ví dụ, PD1, CTLA4, LAG3, BTLA và/hoặc CD27), ví dụ, bao gồm nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết CTLA4; nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết BTLA; nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết LAG3; hoặc nhóm gắn kết PD1, nhóm gắn kết LAG3 và nhóm gắn kết BTLA, tùy ý liên kết qua một hoặc nhiều liên kết, ví dụ, liên kết peptit. Theo một phương án của sáng chế, globulin miễn dịch đa đặc hiệu bao gồm kháng thể miền đơn PD1 liên kết với một hoặc nhiều phân tử được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể miền đơn CTLA4, kháng thể miền đơn LAG3, kháng thể miền đơn BTLA, kháng thể miền đơn CD27 và kháng thể miền đơn PD1 mà gắn kết với epitop giống hoặc khác nhau của kháng thể miền đơn PD1 thứ nhất; ví dụ, bao gồm nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết CTLA4;

nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết BTLA; nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết LAG3; hoặc nhóm gắn kết PD1, nhóm gắn kết LAG3 và nhóm gắn kết BTLA.

Sáng chế bao gồm polypeptit, ISVD hoặc kháng thể miền đơn chứa trình tự axit amin được mô tả ở đây, ví dụ, được chọn từ các SEQ ID NO: 9-40.

Sáng chế còn đề xuất chất gắn kết PD1 theo sáng chế (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) hoặc ISVD đa đặc hiệu như kháng thể miền đơn) kết hợp với chất điều trị khác.

Dụng cụ và chai (ống) tiêm chứa chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) hoặc ISVD đa đặc hiệu như kháng thể miền đơn) tùy ý kết hợp với chất điều trị khác được đề xuất bởi sáng chế.

Sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) hoặc ISVD đa đặc hiệu như kháng thể miền đơn); hoặc vectơ chứa polynucleotit hoặc tế bào chủ chứa polynucleotit hoặc vectơ.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) hoặc ISVD đa đặc hiệu như kháng thể miền đơn) bao gồm bước đưa polynucleotit mã hóa globulin miễn dịch vào tế bào chủ và bước nuôi cấy tế bào chủ trong môi trường trong điều kiện thích hợp để biểu hiện globulin miễn dịch này từ polynucleotit này và, tùy ý, bước tinh chế globulin miễn dịch từ tế bào chủ này và/hoặc môi trường này. Chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) được sản xuất bằng các phương pháp này là một phần của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ngăn PD1 gắn kết với PD-L1 và/hoặc PD-L2 bao gồm cho PD1 này tiếp xúc với chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) hoặc ISVD đa đặc hiệu như kháng thể miền đơn) tùy ý kết hợp với chất điều trị khác.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch trong cơ thể đối tượng bao gồm dùng lượng hiệu quả của chất gắn kết PD1 theo sáng chế (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) hoặc ISVD đa đặc hiệu như kháng thể miền đơn) cho đối tượng tùy ý kết hợp với chất điều trị khác. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư di căn, khối u

rắn, bệnh ung thư máu, bệnh bạch cầu, u lympho, sacom xương, sacom cơ vân, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư tế bào chuyển tiếp của bể thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư Wilm, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư cổ, sacom màng hoạt dịch, bệnh ung thư đầu và cổ, caxinom tế bào vảy, bệnh đa u tủy, bệnh ung thư tế bào thận, u nguyên bào võng mạc, u nguyên bào gan, caxinom tế bào gan, u hắc sắc tố, khối u dạng que ở thận, sacom Ewing, sacom sụn, bệnh ung thư não, u nguyên bào đệm, u màng não, u tuyến yên, u thần kinh tiền đình, u thần kinh ngoại bì nguyên thủy, u nguyên bào tủy, u bào hình sao, u bào hình sao giảm biệt hóa, u thần kinh đệm ít nhánh, u màng não thất, u nhú đám rối màng mạch, đa hồng cầu nguyên phát, bệnh tăng tiểu cầu, bệnh xơ tủy tự phát, sacom mô mềm, bệnh ung thư tuyến giáp, ung thư nội mạc tử cung, ung thư xuất phát từ các tế bào thần kinh nội tiết (carcinoid cancer) hoặc ung thư gan, bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư dạ dày) hoặc bệnh truyền nhiễm (nhiễm khuẩn, nhiễm virut hoặc nhiễm nấm) trong cơ thể đối tượng bao gồm dùng lượng hiệu quả của chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) hoặc ISVD đa đặc hiệu như kháng thể miền đơn) tùy ý kết hợp với chất điều trị khác cho đối tượng. Theo một phương án của sáng chế, đối tượng còn được dùng chất điều trị khác hoặc quy trình điều trị kết hợp với chất gắn kết PD1.

Sáng chế đề xuất chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) mà gắn kết với PD1 bao gồm: CDR1 chứa trình tự axit amin IHAMG (SEQ ID NO: 3) hoặc GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); CDR2 chứa trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V) hoặc VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7; trong đó X là W hoặc V); và CDR3 chứa trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F), mà bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở vị trí 11 (ví dụ, L11V) và 89 (ví dụ, I89L) hoặc một hoặc nhiều đột biến được chọn từ E1D, L11V, A14P, W52aV, N73(Q, P hoặc S), A74S, K83R, I89L, W100aF đối với SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Theo một phương án của sáng chế, các đột biến là E1D, L11V, A14P, K83R và I89L; hoặc L11V, A14P, K83R và I89L. Theo một

phương án của sáng chế, các đột biến là E1D, L11V, A14P, W52aV, N73(Q, P hoặc S), A74S, K83R, I89L, W100aF hoặc L11V,A14P,W52aV, N73(Q, P hoặc S), A74S, K83R, I89L, W100aF. Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 chứa trình tự axit amin: DVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAV ITWSGGITYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRPED TALYYCAGDK HQSSWYDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 57).

Sáng chế còn đề xuất chất gắn kết LAG3 mà gắn kết với LAG3 bao gồm CDR1 chứa trình tự axit amin GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65); CDR2 chứa trình tự axit amin AISESGGRTH (SEQ ID NO: 66); và CDR3 chứa trình tự axit amin TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67), ví dụ, chứa trình tự axit amin: EVQLVE SGGGVVQPGG SLRLSCAASG RTFSDYVMGW FRQAPGKERE FVAAISESGG RTHYADSVKG RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RPEDTALYYC ATTLLWWTSE YAPIKANDYD YWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 64).

Các chất gắn kết PD1 và LAG3 có thể là phân tử đơn như chất gắn kết PD1/LAG3, là một phần của sáng chế, mà gắn kết với PD1 và LAG3 bao gồm: chất gắn kết PD1 bao gồm: CDR1 chứa trình tự axit amin IHAMG (SEQ ID NO: 3) hoặc GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); CDR2 chứa trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V) hoặc VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7; trong đó X là W hoặc V); và CDR3 chứa trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F); và chất gắn kết LAG3 bao gồm: CDR1 chứa trình tự axit amin GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65); CDR2 chứa trình tự axit amin AISESGGRTH (SEQ ID NO: 66); và CDR3 chứa trình tự axit amin TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67); và, tùy ý, chất kéo dài thời gian bán thải, ví dụ, trong đó chất gắn kết PD1 chứa trình tự axit amin:

DVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAV ITWSGGITYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRPED TALYYCAGDK HQSSWYDYWG QGTLVTVSS; và (SEQ ID NO: 57); và chất gắn kết LAG3 chứa trình tự axit amin:

EVQLVE SGGGVVQPGG SLRLSCAASG RTFSDYVMGW FRQAPGKERE FVAAISESGG RTHYADSVKG RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RPEDTALYYC ATTLLWWTSE YAPIKANDYD YWGQGTLVTV SS

(SEQ ID NO: 64); và, tùy ý, chất kéo dài thời gian bán thải. Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1/LAG3 bao gồm các nhóm, ví dụ, theo thứ tự:

- chất gắn kết PD1 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) hoặc 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73X (ví dụ, N73P hoặc N73Q hoặc N73S), A74S, K83R, I89L, W100aF);
- liên kết peptit như 9GS, 20GS hoặc 35 GS (ví dụ, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70));
- chất gắn kết LAG3 11B09 hoặc 11B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L);
- liên kết peptit như 9GS, 20GS hoặc 35 GS (ví dụ, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70));
- chất kéo dài thời gian bán thải như ALB11002; và, tùy ý,
- phần kéo dài đầu tận cùng C như alanin;

hoặc

- chất gắn kết PD1 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) hoặc 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73X (ví dụ, N73P hoặc N73Q hoặc N73S), A74S, K83R, I89L, W100aF);
- liên kết peptit như 9GS, 20GS hoặc 35 GS (ví dụ, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70));
- chất gắn kết PD1 102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) hoặc 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73X (ví dụ, N73P hoặc N73Q hoặc N73S), A74S, K83R, I89L, W100aF);
- liên kết peptit như 9GS, 20GS hoặc 35 GS (ví dụ, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70));
- chất gắn kết LAG3 11B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L);
- liên kết peptit như 9GS, 20GS hoặc 35 GS (ví dụ, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70));
- chất gắn kết LAG3 11B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L);

- liên kết peptit như 9GS, 20GS hoặc 35 GS (ví dụ, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70));
- chất kéo dài thời gian bán thải như ALB11002; và, tùy ý,
- phần kéo dài đầu tận cùng C như alanin.

Chất kéo dài thời gian bán thải là, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết albumin huyết thanh người (human serum albumin - HSA) như ALB11002. Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết HSA bao gồm CDR1 chứa trình tự axit amin GFTFSSFGMS (SEQ ID NO: 60); CDR2 chứa trình tự axit amin SISGSGSDTL (SEQ ID NO: 61); và CDR3 chứa trình tự axit amin GGSLSR (SEQ ID NO: 62), ví dụ, chứa trình tự axit amin EVQLVESGGG VVQPGNSLRL SCAASGFTFS SFGMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLY LQMNSLRPED TALYYCTIGG SLSRSSQGTL VTVSSA (SEQ ID NO: 59). Bản thân các chất kéo dài thời gian bán thải này là một phần của sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1, chất gắn kết LAG3, chất gắn kết HSA và/hoặc chất gắn kết PD1/LAG3 trong dụng cụ hoặc chai (ống) tiêm tùy ý kết hợp với chất điều trị khác. Dụng cụ hoặc chai này là một phần của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit mã hóa chất gắn kết bất kỳ nêu ở đây cũng như vectơ bất kỳ (ví dụ, plasmit) chứa polynucleotit cũng như tế bào chủ bất kỳ (ví dụ, CHO hoặc tế bào nấm như *Pichia*, ví dụ, *P. pastoris*) chứa polynucleotit hoặc vectơ, ví dụ, lạc vị hoặc kết hợp (tích hợp) vào một hoặc nhiều nhiễm sắc thể tế bào chủ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra chất gắn kết bất kỳ nêu ở đây bao gồm bước đưa polynucleotit mã hóa chất gắn kết vào tế bào chủ (ví dụ, CHO hoặc tế bào nấm như *Pichia*, ví dụ, *P. pastoris*) và bước nuôi cấy tế bào chủ trong môi trường trong điều kiện thích hợp để biểu hiện chất gắn kết này từ polynucleotit này và, tùy ý, bước tinh chế chất gắn kết từ tế bào chủ này và/hoặc môi trường này. Tùy ý, vectơ hoặc polynucleotit được tích hợp vào một hoặc nhiều nhiễm sắc thể tế bào chủ. Chất gắn kết bất kỳ được sản xuất bằng phương pháp này cũng là một phần của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ngăn PD1 gắn kết với PD-L1 và/hoặc PD-L2 hoặc để ức chế hoạt tính PD1 bất kỳ, ví dụ, như được bàn luận ở đây, bao gồm cho PD1

này tiếp xúc với chất gắn kết PD1 theo sáng chế (ví dụ, chất gắn kết PD1/LAG3) tùy ý kết hợp với chất điều trị khác. Sáng chế còn đề xuất phương pháp ngăn LAG3 liên kết với MHC lớp II hoặc để ức chế hoạt tính PD1 bất kỳ, ví dụ, như được bàn luận ở đây bao gồm cho LAG3 tiếp xúc với chất gắn kết LAG3 theo sáng chế (ví dụ, chất gắn kết PD1/LAG3) tùy ý kết hợp với chất điều trị khác. Sáng chế còn đề xuất phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch trong cơ thể đối tượng (ví dụ, người) bao gồm dùng lượng hiệu quả chất gắn kết theo sáng chế (ví dụ, chất gắn kết PD1/LAG3) cho đối tượng tùy ý kết hợp với chất điều trị khác. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư di căn, khối u rắn hoặc bệnh ung thư máu) hoặc bệnh truyền nhiễm (ví dụ, nhiễm khuẩn, nhiễm virut hoặc nhiễm nấm) trong cơ thể đối tượng (ví dụ, người) bao gồm dùng lượng hiệu quả chất gắn kết theo sáng chế (ví dụ, chất gắn kết PD1/LAG3) tùy ý kết hợp với chất điều trị khác cho đối tượng. Khi dùng cho đối tượng, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 của sáng chế (ví dụ, chất gắn kết PD1/LAG3) tùy ý được dùng kết hợp với chất điều trị khác hoặc quy trình điều trị, ví dụ, phẫu thuật cắt bỏ khối u.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Bảng liệt kê một số vị trí axit amin mà được đề cập cụ thể ở đây và việc đánh số chúng theo một số hệ thống đánh số khác (như Aho và IMGT)

Fig. 2 (1-5). Trình tự chất gắn kết PD1.

Fig. 3 (A-B). Sắp xếp (sắp hàng) trình tự 102C12 với sự sắp xếp các SEQ ID NO: 9-40 (xem WO 2008/071447, SEQ ID NO: 348).

Fig. 4. Glycan liên kết N chiếm ưu thế đối với các kháng thể đơn dòng sản sinh trong tế bào buồng trứng chuột đồng (chuột túi má) Trung Quốc (glycan liên kết N của CHO) và trong tế bào nấm men được thiết kế (thao tác) di truyền (glycan liên kết N của nấm men được thiết kế di truyền): hình vuông: N-axetylglucosamin (GlcNac); hình tròn: manoza (Man); hình thoi: galactoza (Gal); hình tam giác: fucoza (Fuc).

Fig. 5. Sự gắn kết đơn trị của CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700275 (1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-FLAG3-HIS6) hoặc F023700706 (1PD102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6). GAM=kháng thể thứ hai (thứ cấp) dê

kháng chuột sử dụng để phát hiện kháng thể chuột mà gắn kết với FLAG epitop; α-FLAG + GAM=kháng thể thứ hai dê kháng chuột sử dụng cộng kháng thể chuột mà gắn kết với FLAG epitop ở đầu tận cùng C của cấu trúc.

Fig. 6. Sự gắn kết đơn trị của các tế bào 3A9 biểu hiện LAG3 của người bằng F0237611B09-FLAG-His6 hoặc F023700842 (F0237611B09(L11V,A14P,R41P, N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-FLAG3-HIS6.

Fig. 7 (A-B). Sự gắn kết của (A) CHO biểu hiện PD-1 của người bằng F023700931, F023700924, F023700933 hoặc F023700962 hoặc (B) 3A9 biểu hiện PD-1 của khỉ nâu bằng F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933, F023700962, F023700678 (1PD102C12 (A14P,A74S,K83R)-35GS-ALB11002) hoặc F023701127. ABH0074 + GAM=kháng thể thứ hai dê kháng chuột sử dụng cộng kháng thể chuột ABH0074 mà gắn kết với khung kháng thể miền đơn.

Fig. 8 (A-B). Sự gắn kết của (A) CHO biểu hiện LAG3 của người bằng F023700931, F023700924 hoặc F023700962 hoặc (B) 3A9 biểu hiện LAG3 của khỉ nâu bằng F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933 hoặc F023700962.

Fig. 9 (A-H). Phong bế sự gắn kết giữa (A) PD-L1-Fc của người và CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700275 hoặc F023700706; (B) PD-L2-Fc của người và CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700275 hoặc F023700706; (C) PD-L1-Fc của người và CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933 hoặc F023700962; (D) PD-L2-Fc của người và CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933 hoặc F023700962; (E) PD-L1-Fc của người và CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700931, F023700924, F023700933 hoặc F023700962; (F) PD-L2-Fc của người và CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700931, F023700924, F023700933 hoặc F023700962; (G) PD-L1-Fc của người và CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700929 (1PD102C12

(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-HIS6), F023701190 (1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,W52aV,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6), F023701192 (1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6, hoặc F023701193 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6); (H) PD-L2-Fc của người và CHO-K1 biểu hiện PD1 của người bằng F023700929 (1PD102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-HIS6), F023701190 (1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,W52aV,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6), F023701192 (1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6, hoặc F023701193 (1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,W52aV,N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6). US= Stained; hPD-L1 EC30= cường độ nhuộm màu của hPD-L1-Fc được chuẩn độ để tạo ra 30% cường độ nhuộm màu tối đa có thể thu được; GAH=kháng thể thứ hai dê kháng người sử dụng để phát hiện phần Fc của người của hPD-L1-Fc.

Fig. 10 (A-C). Phong bế LAG3-Fc của người gắn kết với các tế bào Daudi bằng (A) F0237611B09-FLAG3-HIS6, F023700842-FLAG3-HIS6 hoặc LAG3-Fc của người; (B) F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933 hoặc F023700962, LAG3-Fc của người; hoặc (C) F023700924, F023700931 hoặc F023700962 hoặc LAG3-Fc của người. Sec only=chỉ kháng thể thứ hai (GAH/GAM).

Fig. 11 (A-B). Thử nghiệm độ tiếp cận (hệ thử nghiệm bổ sung mảnh enzym beta-galactosidaza) với (A) F023700931; F023701016, F023701017, kháng thể miền đơn đối chứng (IRR00085; chất gắn kết virut hợp bào hô hấp (respiratory syncitia virus - RSV)), F023700933 hoặc F023700962; hoặc (B) F023700924; F023700969, F023700970, kháng thể miền đơn đối chứng (IRR00085), F023700933 hoặc F023700962.

Fig. 12 (A-E). Sự hoạt hóa các tế bào T Jurkat (biểu hiện của luciferaza liên kết điều khiển được với gen khởi đầu IL2) có mặt HSA bằng (A) F023700706 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng (IRR00043; hai kháng thể miền đơn kháng lysozym liên kết với thành phần liên kết 35GS mà có FLAG3-His6 đầu tận cùng C), (B) F023700931

(*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933, F023700962 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng (IRR00085 hoặc IRR00087; chất gắn kết RSV), (C) F023700924 F023700969, F023700970 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng (IRR00043), (D) F023700931, F023701016, F023701017 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng (IRR00043), hoặc (E) F023700706, F023701192 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q, A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6, F023701193 (1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,W52aV, N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng (IRR00088; chất gắn kết RSV).

Fig. 13 (A-R). Sự hoạt hóa bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi ở người (sản sinh IL2) từ nguồn cho (A) 91, (B) 985, (C) 907, (D) 91, (E) 985, (F) 907, (G) 91 (với 10nM SEB), (H) 985 (với 10 nM SEB), (I) 907 (với 10 nM SEB), (J) 91 (với 25 nM SEB), (K) 985 (với 25 nM SEB), (L) 907 (với 25 nM SEB) với F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933, F023700962 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng; hoặc (M) 91 (N) 985 (O) 907 với F023700931, F023700924 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng; hoặc (P) 91, (Q) 985 hoặc (R) 907 với F023700924, F023700969, F023700970.

Fig. 14 (A-F). Thử nghiệm lympho bào trộn lẫn của các tế bào T CD4 và tế bào đuôi gai từ nguồn cho khác nhau xác định (A-C) sự sản sinh interferon-gama ở các nồng độ khác nhau của kháng thể miền đơn F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện) hoặc F023700933 hoặc kháng thể đối chứng; (D-F) sự sản sinh interferon-gama ở các nồng độ khác nhau của kháng thể miền đơn F023700924, F023700969, F023700970, F023700931 F023701016 hoặc F023701017 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng.

Fig. 15 (A-D). Thử nghiệm độ hoạt hóa của tế bào T 3A9 biểu hiện LAG3 ở người có mặt HSA và sự có mặt của (A) F023700656 (11B09 (E1D)), F023700842 hoặc IgG4 đối chứng; (B) F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933 hoặc F023700962 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng (IRR00085 hoặc IRR00087; chất gắn kết RSVs); (C) F023700924, F023700969,

F023700970 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng; (D) F023700931, F023701016, hoặc F023701017 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng.

Fig. 16 (A-B). Sự hoạt hóa tế bào T Jurkat biểu hiện LAG3 của người và PD1 của người và tế bào thể hiện kháng nguyên Raji trong sự có mặt của (A) F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933 hoặc F023700862 [nên là F023700892] hoặc kháng thể miền đơn đối chứng hoặc (B) F023700924, F023700969, F023700970, F023700931, F023701016, F023701017, F023700933 hoặc F023700962 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng.

Fig. 17 (A-C). Sự hoạt hóa dòng vô tính tế bào T ở người (sản sinh interferon-gama) trong sự có mặt của tế bào JY biểu hiện PDL1 của người trong sự có mặt của các nồng độ khác nhau của (A) F023700931 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700924 (*Pichia* hoặc CHO biểu hiện), F023700933 hoặc F023700962 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng; (B) F023700924, F023700969, F023700970, F023700933 hoặc F023700962 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng; hoặc (C) F023700931, F023701016, F023701017, F023700933 hoặc F023700962 hoặc kháng thể miền đơn đối chứng.

Fig. 18 (A-P). Trình tự theo sáng chế.

Fig. 19 (A-I). Khả năng phản ứng của preAb huyết thanh với F023700924 và F023700931 và kháng thể miền đơn đối chứng hóa trị ba T013700112 (thiếu đột biến để làm giảm sự gắn kết kháng thể đã tồn tại trước đó) bằng huyết thanh của đối tượng người khỏe mạnh ở (A) 125 giây và (B) 360 giây; bằng huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh ung thư ở (C) 125 giây hoặc (D) 360 giây; hoặc bằng huyết thanh của bệnh nhân mắc (E) u hắc sắc tố, (F) bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), (G) bệnh ung thư đầu & cổ, (H) bệnh ung thư dạ dày hoặc (I) bệnh ung thư đại trực tràng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất ISVD bao gồm các đột biến mà phong bế khả năng phản ứng của các kháng thể đã có trước đó (tiền kháng thể) với các neo-epitop trong ISVD. Neoepitop là các epitop trong protein được bộc lộ khi protein bị đột biến (ví dụ, cắt cụt) hoặc nếp gấp của nó thay đổi. Các kháng thể đã có trước đó là các kháng thể tồn tại trong cơ thể bệnh nhân trước khi nhận ISVD. ISVD của sáng chế dựa vào, một phần, các kháng

thể lạc đà không bướu có miền ổn định tận cùng C được loại bỏ; do đó, neo-epitop trong đầu tận cùng C của VHH thu được tiếp xúc với sự gắn kết tiền kháng thể. Đã phát hiện ra rằng tổ hợp các đột biến của các gốc 11 và 89 (ví dụ, L11V và I89L hoặc V89L) dẫn đến thiếu sự gắn kết tiền kháng thể. Các đột biến trong gốc 112 còn thể hiện sự gắn kết tiền kháng thể giảm đáng kể. Buyse & Boutton (WO2015/173325) bao gồm dữ liệu thể hiện sự kết hộp của đột biến L11V và V89L tạo ra sự cải thiện rõ rệt trong việc làm giảm sự gắn kết tiền kháng thể so với riêng đột biến L11V hoặc đột biến V89L. Ví dụ, Bảng H của tài liệu Buyse & Boutton trên trang 97 thể hiện dữ liệu so sánh đối với ISVD với riêng đột biến V89L (có hoặc không có phần kéo dài đầu tận cùng C) và cùng ISVD với đột biến V89L kết hợp với đột biến L11V (một lần nữa, có hoặc không có phần kéo dài đầu tận cùng C). Ngoài ra, mặc dù tạo ra trong hai thí nghiệm riêng rẽ, dữ liệu thể hiện ở Bảng H đối với sự kết hợp L11V/V89L khi so sánh với số liệu nêu trong Bảng B đối với riêng đột biến L11V (trong cùng ISVD) thể hiện việc giảm gắn kết tiền kháng thể mà thu được bằng sự kết hợp L11V/V89L tốt hơn là đối với riêng đột biến L11V. Vì cấu trúc khung của lạc đà không bướu được biết đến là được duy trì (bảo toàn) rất cao, nên tác động của các đột biến ở các vị trí 11 và 89 rất thích hợp để tồn tại đối với ISVD bất kỳ. Thật vậy, tác dụng được chứng minh, trên Fig. 19, với các chất gắn kết tức thời, F023700924 và F023700931, thể hiện mức độ gắn kết rất thấp của tiền kháng thể ở đối tượng khỏe mạnh và đối tượng mắc bệnh ung thư.

Trong sáng chế này, các gốc axit amin/vị trí trong miền biến đổi globulin miễn dịch chuỗi nặng sẽ được biểu thị bằng cách đánh số theo Kabat. Để thuận tiện, Fig. 1 đưa ra bảng liệt kê một số vị trí axit amin mà được đề cập cụ thể ở đây và việc đánh số chúng theo một số hệ thống đánh số khác (như Aho và IMGT). Điểm này còn được bàn luận tiếp ở đây.

Đối với CDR, đã biết rõ trong tình trạng kỹ thuật, có nhiều quy tắc để xác định và mô tả CDR của mảnh VH hoặc VHH, như cách xác định Kabat (dựa vào sự biến đổi trình tự và được sử dụng phổ biến nhất) và cách xác định Chothia (dựa vào vị trí các vùng vòng lặp cấu trúc). Tham khảo thông tin trên trang tin điện tử www.bioinf.org.uk/abs/. Đối với bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, cho dù CDR theo Kabat

cũng có thể được nêu, tốt nhất là CDR được xác định dựa vào cách xác định Abm (dựa vào phần mềm mô hình hóa kháng thể AbM của Oxford Molecular), vì nó được coi là thỏa hiệp tối ưu giữa các cách xác định Kabat và Chotia. Tham khảo thông tin trên trang tin điện tử www.bioinf.org.uk/abs/). Xem tài liệu Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 or Chothia, *et al.*, (1989) Nature 342:878-883; Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Elvin A. Kabat, Tai Te Wu, Carl Foeller, Harold M. Perry, Kay S. Gottesman (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest; Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Theo một phương án của sáng chế, việc xác định CDR theo Kabat, ví dụ, trong đó FR1 của VHH bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 1-30, CDR1 của VHH bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 31-35, FR2 của VHH bao gồm axit amin ở các vị trí 36-49, CDR2 của VHH bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 50-65, FR3 của VHH bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 66-94, CDR3 của VHH bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 95-102, và FR4 của VHH bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 103-113.

Theo một phương án của sáng chế, CDR được xác định theo Kontermann and Dübel (Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33-51, 2010).

Thuật ngữ "miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch" (còn được gọi là "ISV" hoặc ISVD") thường được sử dụng để nói đến miền biến đổi globulin miễn dịch (có thể là các miền chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, bao gồm các miền VH, VHH hoặc VL) mà có thể tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng không tương tác với miền biến đổi khác (ví dụ, không có tương tác VH/VL vì yêu cầu giữa các miền VH và VL là kháng thể đơn dòng 4 chuỗi thông thường). Ví dụ về ISVD là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và ví dụ bao gồm các kháng thể miền đơn (bao gồm VHH, VHH được làm giống người và/hoặc VH được làm giống lạc đà như VH của người

được làm giống lạc đà), IgNAR, các miền, các kháng thể (miền đơn) (như dAbs™) là các miền VH hoặc lấy từ miền VH và kháng thể (miền đơn) (như dAbs™) là các miền VL hoặc lấy từ miền VL. ISVD dựa vào và/hoặc lấy từ miền biến đổi chuỗi nặng (như miền VH hoặc VHH) thường được ưu tiên. Tốt nhất là, ISVD là kháng thể miền đơn.

Thuật ngữ "kháng thể miền đơn" thường được xác định trong WO 08/020079 hoặc WO 09/138519, và do đó, theo khía cạnh cụ thể thường biểu thị VHH, VHH được làm giống người hoặc VH được làm giống lạc đà (như VH của người được làm giống lạc đà) hoặc thường là VHH được tối ưu hóa trình tự (như ví dụ, tối ưu hóa về độ ổn định hóa học và/hoặc độ tan, độ chồng lặp tối đa với các vùng khung của người đã biết và biểu hiện tối đa). Lưu ý là các thuật ngữ Nanobody hoặc kháng thể miền đơn là các nhãn hiệu đã đăng ký của Ablynx N.V. và do đó có thể còn được gọi là Nanobody® và/hoặc Nanobodies®). Ví dụ về ISVD là 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L). Các ISVD khác còn xuất hiện trong các Bảng A và C ở đây.

Chất gắn kết đa đặc hiệu (ví dụ, ISVD đa đặc hiệu) là phân tử bao gồm, ví dụ, nhóm gắn kết PD1 hoặc LAG3 thứ nhất (ví dụ, ISVD hoặc kháng thể miền đơn) và một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5) nhóm gắn kết bổ sung (ví dụ, ISVD hoặc kháng thể miền đơn) mà gắn kết với epitop không phải chất gắn kết của nhóm gắn kết PD1 hoặc LAG3 thứ nhất (ví dụ, gắn kết với CTLA4, CD27 và/hoặc BTLA); *ví dụ,* bao gồm nhóm gắn kết PD1 hoặc LAG3 và nhóm gắn kết CTLA4; nhóm gắn kết PD1 hoặc LAG3 và nhóm gắn kết BTLA; một hoặc hai nhóm gắn kết PD1 và một hoặc hai nhóm gắn kết LAG3 và nhóm gắn kết albumin huyết thanh người; hoặc nhóm gắn kết PD1, nhóm gắn kết LAG3 và nhóm gắn kết BTLA. Chất gắn kết đa đặc hiệu là, ví dụ, F023700931 hoặc F023700899.

Nhóm gắn kết hoặc miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết là phân tử như ISVD hoặc kháng thể miền đơn mà gắn kết với kháng nguyên. Nhóm gắn kết hoặc miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết có thể là một phần của phân tử lớn hơn như globulin miễn dịch đa trị hoặc đa đặc hiệu bao gồm nhiều hơn một nhóm, miền hoặc đơn vị và/hoặc bao gồm thành phần chức khác, như, ví dụ, chất kéo dài thời gian bán thải (HLE), thành phần hướng đích và/hoặc phân tử nhỏ như polyetylenglycol (PEG).

Sự gắn kết PD1 hoặc LAG3 đơn trị (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) là phân tử bao gồm miền gắn kết kháng nguyên đơn. Sự gắn kết PD1 hoặc LAG3 hoá trị hai bao gồm hai miền gắn kết kháng nguyên (ví dụ, các kháng thể thông thường bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép). Sự gắn kết PD1 hoặc LAG3 đa trị bao gồm nhiều hơn một miền gắn kết kháng nguyên.

Sự gắn kết PD1 hoặc LAG3 đặc hiệu đơn gắn kết kháng nguyên đơn; sự gắn kết PD1 hoặc LAG3 đặc hiệu kép gắn kết hai kháng nguyên khác nhau và sự gắn kết PD1 hoặc LAG3 đa đặc hiệu gắn kết với nhiều hơn một kháng nguyên.

Chất gắn kết PD1 hoặc LAG3 có hai vị trí nhận diện kháng nguyên là đặc hiệu đơn nhưng gắn kết với hai epitop khác nhau của cùng kháng nguyên. Chất gắn kết PD1 hoặc LAG3 nhiều vị trí nhận diện kháng nguyên gắn kết với cùng kháng nguyên nhưng với nhiều hơn một epitop trong kháng nguyên.

Thuật ngữ "thời gian bán thải" được sử dụng ở đây liên quan đến chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 hoặc ISVD, kháng thể miền đơn, sinh học dựa vào ISVD, sinh học dựa vào kháng thể miền đơn hoặc polypeptit khác bất kỳ nêu ở đây có thể thường được xác định như được mô tả ở đoạn o) trên trang 57 của WO 08/020079 và được nêu ở đây là nói đến thời gian cần để nồng độ huyết thanh của polypeptit giảm đi 50%, *in vivo*, ví dụ do sự suy giảm của polypeptit và/hoặc sự thanh thải hoặc cô lập polypeptit bằng cơ chế tự nhiên. Thời gian bán thải *in vivo* của polypeptit theo sáng chế có thể được xác định theo cách bất kỳ đã biết về thực chất, như bằng cách phân tích dược động học. Các kỹ thuật thích hợp sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và có thể, ví dụ, nói chung là được mô tả ở đoạn o) trên trang 57 của WO 08/020079. Còn được nêu ở đoạn o) trên trang 57 của WO 08/020079, thời gian bán thải có thể được biểu hiện sử dụng các thông số như t1/2-alpha, t1/2-beta và diện tích dưới đường cong (under the curve - AUC). Đối với vấn đề này, cần lưu ý là thuật ngữ "thời gian bán thải" khi được sử dụng ở đây đặc biệt đề cập đến t1/2-beta hoặc thời gian bán thải tận cùng (trong đó t1/2-alpha và/hoặc AUC hoặc cả hai có thể được giữ không liên quan đến nghiên cứu). Tham khảo, ví dụ, phần thử nghiệm dưới đây, cũng như theo sổ tay tiêu chuẩn, như Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for

Pharmacists and Peters et al, Pharmacokinete analysis: A Practical Approach (1996). Cũng tham khảo "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, xuất bản bởi Marcel Dekker, ấn bản lần 2 có sửa chữa (1982). Tương tự, các thuật ngữ "tăng thời gian bán thải" hoặc "thời gian bán thải tăng" còn được xác định ở đoạn o) trên trang 57 của WO 08/020079 và cụ thể là nói đến việc tăng t1/2-beta, có hoặc không có việc tăng t1/2-alpha và/hoặc AUC hoặc cả hai.

Khi thuật ngữ không được xác định cụ thể ở đây, nó có nghĩa thông dụng trong lĩnh vực này, mà sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, ví dụ, sổ tay tiêu chuẩn, như Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old *et al.*, "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt *et al.*, Roitt's Essential Immunology, 10th Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); và Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), cũng như tình trạng kỹ thuật cơ bản chung được trích dẫn ở đây.

Đối với phần mô tả chung về polypeptit đa hóa trị và đa đặc hiệu chứa một hoặc nhiều kháng thể miền đơn và việc điều chế chúng, tham khảo Conrath *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302; cũng như, ví dụ, WO 96/34103, WO 99/23221, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 hoặc WO 2009/068627.

Chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 "phân lập được" (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn), polypeptit, polynucleotit và vectơ, ít nhất một phần không chứa các phân tử sinh học khác từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào mà chúng được tạo ra. Các phân tử sinh học này bao gồm axit nucleic, protein, lipit, hydrat cacbon, hoặc chất khác như mảnh tế bào và môi trường sinh trưởng. Chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 "phân lập

được" có thể còn ít nhất một phần không chứa các thành phần của hệ biểu hiện như các phân tử sinh học từ tế bào chủ hoặc môi trường sinh trưởng của nó. Nói chung, thuật ngữ "phân lập được" không nhằm để nói đến sự vắng mặt hoàn toàn của phân tử sinh học hoặc không có mặt nước, chất đệm, hoặc muối hoặc các thành phần của dược phẩm mà bao gồm kháng thể hoặc mảnh kháng thể.

Cụm từ "trình tự điều khiển" là nói đến polynucleotit cần để biểu hiện trình tự mã hóa liên kết điều khiển được trong cơ quan vật chủ cụ thể. Trình tự điều khiển thích hợp đối với sinh vật chưa có nhân điển hình, ví dụ, bao gồm gen khởi đầu, tùy ý trình tự gen điều khiển, và vị trí gắn kết ribosom. Tế bào có nhân điển hình được biết là sử dụng gen khởi đầu, tín hiệu polyadenyl hóa, và chất tăng cường.

Axit nucleic hoặc polynucleotit được "liên kết điều khiển được" khi đặt trong mối quan hệ chức năng với polynucleotit khác. Ví dụ, ADN đối với trình tự tiền thân (presequence) hoặc chất dẫn bài tiết được liên kết điều khiển được với ADN đối với polypeptit nếu nó biểu hiện ở dạng protein tiền thân (preprotein) mà tham gia vào sự bài tiết của polypeptit; gen khởi đầu hoặc chất tăng cường được liên kết điều khiển được với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự; hoặc vị trí gắn kết ribosom được liên kết điều khiển được với trình tự mã hóa nếu nó được đặt sao cho thuận lợi để dịch mã. Nói chung, nhưng đôi khi, "liên kết điều khiển được" nghĩa là trình tự ADN được liên kết là liền kề, và, trong trường hợp chất dẫn bài tiết, liền kề và trong pha đọc. Tuy nhiên, chất tăng cường không phải là liền kề. Liên kết được thực hiện bằng cách nối ở các vị trí giới hạn thuận lợi. Nếu các vị trí này không tồn tại, thì bộ phận nối hoặc liên kết oligonucleotit tổng hợp được sử dụng theo thực tế thông thường. Sáng chế bao gồm polynucleotit mã hóa chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 mà, tùy ý, được liên kết điều khiển được với một hoặc nhiều trình tự điều khiển như gen khởi đầu.

Chất gắn kết "PD1 và/hoặc LAG3" là nói đến chất gắn kết bao gồm:

- chất gắn kết PD1; hoặc
- chất gắn kết LAG3; hoặc
- cả chất gắn kết PD1 và chất gắn kết LAG3 (nghĩa là, chất gắn kết "PD1/LAG3")

và, tùy ý, chất gắn kết khác mà gắn kết với, ví dụ, albumin huyết thanh người. Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1/LAG là

- 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-11B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A; hoặc
- 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-11B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-11B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A;

như nêu ở đây.

Xem F023700924 hoặc F023700931 ở đây. Chất gắn kết PD1/LAG3 bao gồm chất gắn kết PD1 và chất gắn kết LAG3.

Phạm vi theo sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 bất kỳ nêu trên Fig. 18 (A-P) (hoặc chất gắn kết PD1 bất kỳ bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chất gắn kết PD1 này), chất gắn kết LAG3 bất kỳ nêu trên Fig. 18 (A-P) (hoặc chất gắn kết LAG3 bất kỳ bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chất gắn kết LAG3 này) hoặc chất gắn kết PD1/LAG3 bất kỳ nêu trên Fig. 18 (A-P) hoặc chất gắn kết PD1/LAG3 bất kỳ bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của nhóm gắn kết PD1 và/hoặc nhóm gắn kết LAG3 của chúng. Chất gắn kết nêu trên Fig. 18 (A-P), theo một phương án của sáng chế, không bao gồm chất kéo dài đầu tận cùng C (ví dụ, A), các thẻ FLAG và/hoặc HIS ở đây (ví dụ, HHHHHH (các axit amin 29-34 hoặc SEQ ID NO: 68); AAAHHHHHH (SEQ ID NO: 69); hoặc AAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH (SEQ ID NO: 68)). Chất gắn kết này hoặc CDR bất kỳ có thể, theo một phương án, là biến thể của các chất gắn kết được nêu trên Fig. 18 (A-P), ví dụ, bao gồm các đột biến điểm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 (ví dụ, xóa đoạn hoặc thay thế bảo toàn).

Nói chung, đơn vị cấu trúc kháng thể cơ bản bao gồm tetrame. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25 kDa) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70 kDa). Phần tận cùng amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi chứa khoảng từ 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chủ yếu có chức năng nhận diện kháng nguyên. Phần tận cùng carboxy của chuỗi nặng có thể xác định

vùng ổn định chủ yếu có chức năng tác động. Thông thường, chuỗi nhẹ của người được phân loại là chuỗi nhẹ kapa và lamda. Hơn nữa, chuỗi nặng của người thường được phân loại là mu, delta, gama, alpha, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể lần lượt là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, các vùng biến đổi và vùng ổn định được liên kết bằng vùng "J" chứa khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng còn bao gồm vùng "D" chứa khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. Nói chung, xem tài liệu Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989).

Ví dụ về mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các mảnh Fab, Fab', $F(ab')_2$, và Fv, và phân tử Fv chuỗi đơn.

"Chất gắn kết PD1" hoặc "PD1 ISVD" hoặc "kháng thể miền đơn PD1" là nói đến chất gắn kết hoặc ISVD hoặc kháng thể miền đơn, tương ứng, mà gắn kết với PD1. Quy ước tương tự có thể được áp dụng đối với các phân tử mà gắn kết với LAG3 hoặc CTLA4 hoặc kháng nguyên khác.

Các đặc điểm sau được kết hợp với các đột biến được chỉ định trong chất gắn kết PD1 102C12:

E1D: Ngăn sự hình thành axit pyroglutamic trong axit amin thứ nhất của cấu trúc E1

L11V: Giảm sự gắn kết tiền kháng thể

A14P: Nhân hóa

W52aV: Ngăn sự oxy hóa của W52a

N73P: Ngăn sự khử amit hóa N73

N73Q: Ngăn sự khử amit hóa N73

N73S: Ngăn sự khử amit hóa N73

A74S: Nhân hóa

K83R: Nhân hóa

I89L: Giảm sự gắn kết tiền kháng thể

W100aF: Ngăn sự oxy hóa của W100a

hoặc chất gắn kết LAG3 11B09:

L11V: Giảm sự gắn kết tiền kháng thể

A14P: Nhân hóa

R41P: Nhân hóa

N43K: Nhân hóa

A62S: Nhân hóa

A74S: Nhân hóa

K83R: Nhân hóa

V89L: Giảm sự gắn kết tiền kháng thể

Theo một phương án của sáng chế, PD1 là PD1 của người. Theo một phương án của sáng chế, PD1 của người chứa trình tự axit amin:

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

(SEQ ID NO: 137)

Theo một phương án của sáng chế, LAG3 là LAG3 của người. Theo một phương án của sáng chế, LAG3 của người chứa trình tự axit amin:

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL QDLSLLRRAG
VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT VLSVGPGGLR SGRLPLQPRV
QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR
ASDWVILNCS FSRPDRPASV HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG
CILTYRDGFN VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLQEQ QLNATVTLAI ITVTPKSFGS
PGSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA QEAQLLSQPW QCQLYQGERL
LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP
RRFSALEQGI HPPQAQSKIE ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

(SEQ ID NO: 138)

Chất gắn kết PD1

Sáng chế đề xuất các chất gắn kết PD1 được cải thiện, ví dụ, ISVD PD1 được cải thiện và cụ thể hơn là các kháng thể miền đơn PD1 được cải thiện. Chất gắn kết PD1 được cải thiện bởi sáng chế còn được đề cập đến ở đây là "chất gắn kết PD1 theo sáng chế" hoặc "chất gắn kết PD1".

Khi bàn luận ở đây, chất gắn kết PD1 đơn trị theo sáng chế sẽ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, nhưng bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 hoặc 112 (hoặc ở vị trí đột biến bất kỳ trong các vị trí đột biến nêu ở đây liên quan đến chất gắn kết PD1 theo sáng chế).

Khi bàn luận ở đây, chất gắn kết PD1 đa đặc hiệu, ví dụ, bao gồm LAG3, sẽ bao gồm các nhóm gắn kết PD1 bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 trong các chất gắn kết PD1 nêu dưới đây trong Bảng A-1 và A-2 (ví dụ, trong 102C12 hoặc đối chứng A). Tùy ý, nhóm gắn kết PD1 của chất gắn kết đa đặc hiệu bao gồm axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 nhưng bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 hoặc 112.

Sáng chế đề xuất các chất gắn kết PD1 được cải thiện, ví dụ, SVD PD1 được cải thiện và cụ thể hơn là các kháng thể miền đơn PD1 được cải thiện. Chất gắn kết PD1 theo sáng chế bao gồm polypeptit là các biến thể của polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 đột biến ở vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112. Chất gắn kết PD1 được cải thiện theo sáng chế còn được đề cập đến ở đây là "chất gắn kết PD1 theo sáng chế" hoặc "chất gắn kết PD1". Các thuật ngữ này bao gồm phân tử bất kỳ mà gắn kết với PD1 và bao gồm phân tử bất kỳ mà gắn kết với PD1 được nêu ở đây. Ví dụ, các thuật ngữ này bao gồm ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 9-40 và 57 cũng như kháng thể thông thường bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm trình tự axit amin nêu trong các thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 9-40 và 57; globulin miễn dịch đa đặc hiệu, như globulin miễn dịch đặc hiệu kép (ví dụ, ISVD) bao gồm trình tự axit amin nêu trong thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 9-40 và 57, gắn kết với PD1 và còn gắn kết với kháng nguyên khác

như epitop khác nhau của PD1, CD27, LAG3, CTLA4, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2 CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17, TSLP, ví dụ, bao gồm nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết CTLA4; nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết BTLA; nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết LAG3; hoặc nhóm gắn kết PD1, nhóm gắn kết LAG3 và nhóm gắn kết BTLA. Chất gắn kết PD1 đa hóa trị chứa nhiều hơn một miền gắn kết kháng nguyên, ví dụ nhiều hơn một ISVD (một hoặc nhiều trong số đó gắn kết với PD1). Chất gắn kết PD1 đặc hiệu đơn gắn kết kháng nguyên đơn (PD1); chất gắn kết PD1 đặc hiệu kép gắn kết với hai kháng nguyên khác nhau (một trong số đó là PD1) và chất gắn kết PD đa đặc hiệu gắn kết với nhiều hơn một kháng nguyên (một hoặc nhiều chất gắn kết là PD1 và một hoặc nhiều kháng nguyên là kháng nguyên khác nhau). Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 chứa trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 106-124.

Cụ thể hơn, sáng chế nhằm mục đích đề xuất chất gắn kết PD1 được cải thiện là các biến thể của 102C12 và đối chứng A (Tham chiếu A) và làm giảm sự gắn kết bằng các yếu tố giao thoa (thường được gọi là "các kháng thể đã có trước đó") có thể có mặt trong huyết thanh của một số đối tượng người khỏe mạnh cũng như của bệnh nhân. Xem WO 12/175741, WO 2013/024059 và, ví dụ, còn cả tài liệu Holland *et al.* (J. Clin. Immunol. 2013, 33(7):1192-203) cũng như đơn PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Như được mô tả tiếp ở đây, chất gắn kết PD1 theo sáng chế tốt hơn là có cùng tổ hợp CDR (nghĩa là, CDR1, CDR2 và CDR3) như có mặt trong 102C12 hoặc trong đối chứng A (Tham chiếu A). WO 2008/071447 mô tả các kháng thể miền đơn mà có thể gắn kết với PD1 và việc sử dụng chúng. SEQ ID NO: 348 của WO 2008/071447 bộc lộ kháng thể miền đơn đặc hiệu PD-1 gọi là 102C12, trình tự của kháng thể này nêu ở đây là SEQ ID NO: 1. Hơn nữa, biến thể của 102C12 với sự thay thế Q108L nhân hóa (ở đây còn gọi là "*Đối chứng A*" (Tham chiếu A)) được sử dụng ở đây làm hợp chất đối chứng

và trình tự của nó được nêu ở đây là SEQ ID NO: 2. Sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 chứa đột biến ở vị trí 108, ví dụ, Q108L.

Sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 là các biến thể của 102C12 và chất gắn kết PD1/LAG3 bao gồm các biến thể của 102C12 được nêu dưới đây trong Bảng A-2 dưới đây. Phạm vi theo sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của các biến thể nêu dưới đây trong Bảng A-2 cũng như chất gắn kết PD1/LAG3 bao gồm nhóm gắn kết PD1 bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của các biến thể nêu dưới đây trong Bảng A-2.

Bảng A-1. Chất gắn kết PD1 102C12.

SEQ ID NO	**Mô tả**	**Trình tự**
1	WO 2008/071447, SEQ ID NO: 348 (102C12) (ở đây có thể được gọi là "1PD102C12")	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQA PGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAIYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTQVTVSS
2	Đối chứng (Tham chiếu) A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQA PGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAIYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSS

Bảng A-2. Chất gắn kết PD1 của biến thể được tối ưu hóa trình tự 102C12 (tùy ý dung hợp với chất gắn kết HSA)

monome SO 1PD102C12 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) Đích: hPD-1	DVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAAS**GSIAS IHAMG**WFRQA PGKEREFVA**V ITWSGGITY**Y ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRPED TALYYCAG**DK HQSSWYDY**WG QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 57		
SEQ ID NO: 3	Chất gắn kết PD1 CDR1 (Kabat)	**IHAMG**
SEQ ID NO: 4	Chất gắn kết PD1 CDR2 (Kabat)	**VITXSGGITY**YADSVKG trong đó X là W hoặc V (ví dụ, VITwSGGITYYADSVKG hoặc VITvSGGITYYADSVKG)
SEQ ID NO: 5	Chất gắn kết PD1 CDR3 (Kabat/Abm)	**DKHQSSXYDY** trong đó X là W hoặc F (ví dụ, DKHQSSwYDY hoặc DKHQSSfYDY)
SEQ ID NO: 6	Chất gắn kết PD1 CDR1 (Abm)	**GSIAS**IHAMG
SEQ ID NO: 7	Chất gắn kết PD1 CDR2 (Abm)	**VITXSGGITY** trong đó X là W hoặc V (ví dụ, VITwSGGITY hoặc VITvSGGITY)
SEQ ID NO: 8	Chất gắn kết PD1 CDR3 (Kabat/Abm)	**DKHQSSXYDY** trong đó X là W hoặc F (ví dụ, DKHQSSwYDY hoặc DKHQSSfYDY)
Tên: F023700275 Mô tả: 1PD102C12 (A14P,A74S,K83R) Đích: hPD-1 SEQ ID NO: 98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GSIAS**IHAMGWFRQAP GKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAIYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSS	

Monome SO 1PD102C12 Tên: F023700706 hoặc F023700929 Mô tả: 1PD102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) Đích: hPD-1 SEQ ID NO: 99	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSS
SO 1PD102C12 + ALB11002 đơn trị Tên: F023701127 Mô tả: 1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1 SEQ ID NO: 101	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
SO 1PD102C12 + ALB11002 hóa trị hai Tên: F023700933 Mô tả: 1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1 SEQ ID NO: 102	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

Monome SO 1PD102C12 được tăng cường Tên: F023701190 Mô tả: 1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,A74S,K83R,I89L,W100aF) Đích: hPD-1 SEQ ID NO: 103 *Tùy ý, F023701190 chứa đột biến N73X như N73S	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAP GKEREFVA**VITVSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSS
Monome SO 1PD102C12 được tăng cường Tên: F023701192 Mô tả: 1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89L,W100aF) Đích: hPD-1 SEQ ID NO: 104	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAP GKEREFVA**VITVSGGITY**YADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSS
Monome SO 1PD102C12 được tăng cường Tên: F023701193	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAP GKEREFVA**VITVSGGITY**YADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSS

Mô tả: 1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,W52aV,N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF) Đích: hPD-1 SEQ ID NO: 105	
F023700641 Mô tả: 1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-35GS-1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-35GS-ALB11002 Đích: hPD-1 SEQ ID NO: 126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) các axit amin 1-119 của SEQ ID NO: 113	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITY**YADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSS
1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF) các axit amin 1-119 của SEQ ID NO: 117	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITY**YADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSS

1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF) các axit amin 1-119 của SEQ ID NO: 121	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAP GKEREFVA**VITVSGGITY**YADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSS

*Chất gắn kết PD1 CDR được gạch chân và/hoặc in đậm

Sáng chế bao gồm các phương án trong đó chất gắn kết PD1 bao gồm một, hai hoặc ba CDR trong chất gắn kết PD1 được nêu ở trên trong Bảng A-1 hoặc A-2 (ví dụ, SEQ ID NO: 57, 98, 99, 103, 104 hoặc 105) mà bao gồm 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5 sự thay thế axit amin, ví dụ, thay thế bảo toàn, và/hoặc bao gồm 100, 99, 98, 97, 96 hoặc 95% độ đồng nhất trình tự so với trình tự CDR nêu trong bảng A-1 hoặc A-2 trong đó chất gắn kết PD1 có CDR giữ lại khả năng gắn kết với PD1. Theo một phương án của sáng chế, axit amin thứ nhất của chất gắn kết PD1 theo sáng chế là E. Theo một phương án của sáng chế, axit amin thứ nhất của chất gắn kết PD1 theo sáng chế là D. Các chất gắn kết PD1/LAG3 chứa chất gắn kết PD1/LAG3 là một phần của sáng chế.

Sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 bất kỳ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, 98, 99, 103, 104 hoặc 105 hoặc trình tự axit amin chứa 80% hoặc nhiều hơn (ví dụ, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%) độ đồng nhất trình tự axit amin (nghĩa là, so sánh các trình tự axit amin đầy đủ) trong đó chất gắn kết PD1 giữ lại khả năng gắn kết với PD1 và, tùy ý, bao gồm chất gắn kết HSA. Các chất gắn kết PD1/LAG3 chứa chất gắn kết PD1/LAG3 là một phần của sáng chế.

Chất gắn kết PD1 được mô tả ở dạng "102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L)" là nói đến chất gắn kết có trình tự 102C12 (SEQ ID NO: 1) hoặc đối chứng (Tham chiếu) A (SEQ ID NO: 2), nhưng trong đó trình tự này chứa các đột biến E1D, L11V, A14P, A74S, K83R và I89L. Ký hiệu này được sử dụng trong suốt bản mô tả liên quan đến một loạt các chất gắn kết khác nhau. Ví dụ, "11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L)" là nói đến chất gắn kết LAG3 chứa trình tự axit amin 11B09

(SEQ ID NO: 64), nhưng trong đó trình tự này chứa các đột biến L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R và V89L.

Cách đánh số gốc theo Kabat đối với một số gốc nhất định của chất gắn kết PD1 nêu trong bảng A được thể hiện theo trình tự dưới đây:

E_1VQLVESGGG$L_{11}V_{12}Q_{13}A_{14}$GGSLRLSCAAS$G_{26}S_{27}I_{28}A_{29}S_{30}$IHAMGW$_{36}F_{37}R_{38}Q_{39}AP_{41}$GKER$E_{46}F_{47}V_{48}A_{49}$VITW$_{52a}$SGGITYYADSVKG$R_{66}F_{67}T_{68}I_{69}S_{70}RDN_{73}A_{74}$KNTVYLQ$M_{82}N_{82a}S_{82b}L_{82c}K_{83}P_{84}EDT_{87}A_{88}I_{89}Y_{90}Y_{91}$CAGDKHQSSW$_{100a}$YDYW$_{103}G_{104}Q_{105}G_{106}T_{107}L_{108}V_{109}T_{110}V_{111}S_{112}S_{113}$ (SEQ ID NO: 2).

Cách đánh số gốc theo Kabat đối với một số gốc nhất định của 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) được thể hiện theo trình tự dưới đây:

D_1VQLVESGGG V_{11}VQP_{14}GGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAV ITWSGGITYY ADSVKGRFTI SRDNS_{74}KNTVY LQMNSLR_{83}PED TAL_{89}YYCAGDK HQSSWYDYWG QGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 57). Tùy ý, gốc 1 là E.

Các đột biến có thể được đề cập đến ở đây và được đặt tên theo cách đánh số Kabat như được thể hiện ở trên.

Một số chất gắn kết PD1 được ưu tiên, nhưng không giới hạn theo sáng chế là 102C12 (E1D (tùy ý), L11V, A14P, A74S, K83R, I89L), chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99 hoặc 101-105 hoặc được liệt kê trên Fig. 2, Fig. 3 hoặc Fig. 18 (A-P). Các chất gắn kết PD1 của các SEQ ID NO: 24 đến 40, 101 hoặc 102 là các ví dụ về chất gắn kết PD1 theo sáng chế có sự kéo dài alanin đầu tận cùng C, nghĩa là gốc alanin ở đầu tận cùng C của trình tự ISVD (đôi khi còn được gọi là "vị trí 114") so với trình tự đầu tận cùng C thông thường VTVSS (SEQ ID NO: 52, có mặt trong Đối chứng A). Sự kéo dài alanin đầu tận cùng C này có thể ngăn sự gắn kết được gọi là "các kháng thể đã có trước đó" (giả sử là IgG) với epitop giả định mà được đặt ở vùng tận cùng C của ISV. Epitop này được cho là bao gồm, trong số các gốc khác, các gốc axit amin tiếp xúc bề mặt của trình tự đầu tận cùng C VTVSS (SEQ ID NO: 52) cũng như gốc axit amin ở vị trí 14 (và các gốc axit amin gần/sát với các gốc trong trình tự axit amin, như các vị trí 11, 13 và 15) và có thể còn chứa gốc axit amin ở vị trí 83 (và các

gốc axit amin gần/sát với các gốc trong trình tự axit amin, như các vị trí 82, 82a, 82b và 84) và/hoặc gốc axit amin ở vị trí 108 (và các gốc axit amin gần/sát với các gốc trong trình tự axit amin, như vị trí 107).

Tuy nhiên, mặc dù sự có mặt của alanin đầu tận cùng C này (hoặc phần kéo dài đầu tận cùng C nói chung) có thể giảm đi rất nhiều (hoặc, trong một số trường hợp, chủ yếu ngăn toàn bộ) sự gắn kết của "các kháng thể đã có trước đó" mà có thể được tìm thấy trong huyết thanh của một nhóm đối tượng (cả đối tượng khỏe mạnh và đối tượng mắc tình trạng bệnh lý hoặc bệnh), đã phát hiện ra rằng huyết thanh của một số đối tượng (như huyết thanh của bệnh nhân mắc một số bệnh miễn dịch như SLE) có thể chứa các kháng thể đã có trước đó mà có thể gắn kết với vùng tận cùng C của ISV (khi vùng này lộ ra) ngay cả khi ISV chứa alanin đầu tận cùng C (hoặc thông thường hơn là, phần kéo dài đầu tận cùng C).

Do đó, mục đích cụ thể của sáng chế là đề xuất chất gắn kết PD1 là các biến thể được cải tiến của kháng thể miền đơn PD1 được đề cập đến ở đây là "Đối chứng A" (Tham chiếu A) và có sự gắn kết giảm nhờ "các kháng thể đã có trước đó", và đặc biệt là loại được mô tả trong PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325) (nghĩa là, các kháng thể đã có trước đó này mà có thể gắn kết với vùng tận cùng C được lộ ra của ISV ngay cả trong sự có mặt của phần kéo dài đầu tận cùng C).

Sáng chế đề xuất chất gắn kết PD1 chứa các trình tự axit amin là các biến thể của trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 mà bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2:

- 1D hoặc 1E;
- 11V;
- 14P;
- 52aV
- 73Q, 73P hoặc 73S
- 74S;
- 83R;
- 89T hoặc 89L;

- 100aF
- 1D hoặc 1E kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R và 89L;
- 1D kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73Q 73S hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và 100aF;
- 1E kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và 100aF;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R và 100aF, và tùy ý, 1D;
- 89L kết hợp với 11V;
- 89L kết hợp với 110K hoặc 110Q;
- 89L kết hợp với 112K hoặc 112Q;
- 89L kết hợp với 11V, 14P,74S, 83R, và, tùy ý, 1D;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và 100aF và tùy ý, 1D;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và 100aF và tùy ý, 1D;
- 89L kết hợp với 11V và 110K hoặc 110Q;
- 89L kết hợp với 11V và 112K hoặc 112Q;
- 11V kết hợp với 110K hoặc 110Q; hoặc
- 11V kết hợp với 112K hoặc 112Q.

Cụ thể, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) được đề xuất bởi sáng chế bao gồm biến thể của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 trong đó, theo một phương án của sáng chế:

- gốc axit amin ở vị trí 1 được chọn từ E và D;
- gốc axit amin ở vị trí 11 được chọn từ L và V;
- gốc axit amin ở vị trí 14 được chọn từ A và P;
- gốc axit amin ở vị trí 52a được chọn từ W và V;
- gốc axit amin ở vị trí 73 được chọn từ N, S, P và Q;
- gốc axit amin ở vị trí 74 được chọn từ A hoặc S;
- gốc axit amin ở vị trí 83 được chọn từ K hoặc R;
- gốc axit amin ở vị trí 89 được chọn từ T, V, I hoặc L;

- gốc axit amin ở vị trí 100a được chọn từ W và F;
- gốc axit amin ở vị trí 110 được chọn từ T, K hoặc Q; và/hoặc
- gốc axit amin ở vị trí 112 được chọn từ S, K hoặc Q;

ví dụ, trong đó chất gắn kết PD1 bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau:

(i) vị trí 1 là D hoặc E;

(ii) vị trí 11 là V;

(iii) vị trí 14 là P;

(iv) vị trí 52a là V;

(v) vị trí 73 là P, S hoặc Q;

(vi) vị trí 74 là S;

(vii) vị trí 83 là R;

(viii) vị trí 89 là T hoặc L;

(ix) vị trí 100a là F;

ví dụ, bao gồm tập hợp các đột biến sau:

a. vị trí 1 là D hoặc E, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 74 là S, vị trí 83 là R; và vị trí 89 là L;

b. vị trí 1 là D hoặc E, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 52a là V; vị trí 73 là S, P hoặc Q; vị trí 74 là S, vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; và vị trí 100a là F;

c. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V;

d. vị trí 89 là L và vị trí 110 là K hoặc Q;

e. vị trí 89 là L và vị trí 112 là K hoặc Q;

f. vị trí 1 là D hoặc E, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 52a là V; vị trí 73 là S, P hoặc Q; vị trí 74 là S, vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; vị trí 100a là F và vị trí 110 là K hoặc Q;

g. vị trí 1 là D hoặc E, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 52a là V; vị trí 73 là S, P hoặc Q; vị trí 74 là S, vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; vị trí 100a là F và vị trí 112 là K hoặc Q;

h. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V và vị trí 110 là K hoặc Q;

i. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V và vị trí 112 là K hoặc Q;

j. vị trí 11 là V và vị trí 110 là K hoặc Q; và/hoặc

k. vị trí 11 là V và vị trí 112 là K hoặc Q;

so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2

Theo các phương án cụ thể, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế chứa các trình tự axit amin là các biến thể của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 trong đó vị trí 89 là T hoặc L, hoặc trong đó 1 là D hoặc E, 11 là V, 14 là P, 74 là S, 83 là R và 89 là L hoặc trong đó vị trí 11 là V và vị trí 89 là L (tùy ý kết hợp phù hợp với đột biến 110K hoặc 110Q và/hoặc đột biến 112K hoặc 112Q, và cụ thể là kết hợp với đột biến 110K hoặc 110Q) cũng là một phần của sáng chế. Sáng chế bao gồm các trình tự axit amin, trong đó vị trí 11 là V và vị trí 89 là L, tùy ý với đột biến 110K hoặc 110Q.

Như đã nêu, các chất gắn kết PD1 được đề xuất bởi sáng chế mô tả ở đây có thể gắn kết (và cụ thể, có thể đặc biệt gắn kết) với PD-1. Theo một phương án của sáng chế, chúng có thể gắn kết với PD1 và ức chế sự gắn kết giữa PD1 và PD-L1 và/hoặc PD-L2. Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, các chất gắn kết PD1 theo sáng chế, gắn kết với PD-1 và giải phóng tế bào T khỏi sự ức chế qua trung gian con đường PD-1 của đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T (ví dụ, bằng cách giải phóng tế bào T khỏi sự ức chế tăng sinh và sản sinh xytokin qua trung gian PD1)

Bảng B liệt kê một số tổ hợp có thể có không giới hạn của các gốc axit amin mà có thể có mặt ở các vị trí 11, 89, 110 và 112 trong chất gắn kết PD1 theo sáng chế.

Bảng B. Tổ hợp có thể có của các đột biến ở các vị trí axit amin 11, 89, 110 và 112 trong biến thể chất gắn kết PD1 của các SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

	Vị trí					**Vị trí**			
	11	**89**	**110**	**112**		**11**	**89**	**110**	**112**
	L	T	T	S		V	T	T	S
	L	T	T	K		V	T	T	K
Tổ	L	T	T	Q	**Tổ**	V	T	T	Q
hợp	L	T	K	S	**hợp**	V	T	K	S

	L	T	Q	S		V	T	Q	S
	L	V	T	K		V	V	T	K
	L	V	T	Q		V	V	T	Q
	L	V	K	S		V	V	K	S
	L	V	Q	S		V	V	Q	S
	L	I	T	K		V	I	T	K
	L	I	T	Q		V	I	T	Q
	L	I	K	S		V	I	K	S
	L	I	Q	S		V	I	Q	S
						V	L	T	S
	L	L	T	K		V	L	T	K
	L	L	T	Q		V	L	T	Q
	L	L	K	S		V	L	K	S
	L	L	Q	S		V	L	Q	S

Các vị trí này có thể được kết hợp với các đột biến như E1D, A14P, A74S và/hoặc K83R (và/hoặc các đột biến khác).

Các chất gắn kết PD1 được đề xuất bởi sáng chế còn được mô tả trong phần mô tả, phần ví dụ thực hiện sáng chế và phần hình vẽ ở đây, nghĩa là chúng có CDR như mô tả ở đây và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự (như được xác định ở đây) với trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 là như được bộc lộ ở đây và/hoặc có thể có một số giới hạn về "sự khác biệt axit amin" (như được mô tả ở đây) với (một trong số) các trình tự đối chứng này.

Chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 hoặc 2 và một hoặc nhiều đột biến ở vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112, tốt hơn là bao gồm các CDR sau (theo quy ước Kabat):

- CDR1 (theo Kabat) là trình tự axit amin IHAMG (SEQ ID NO: 3); và

- CDR2 (theo Kabat) là trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Kabat) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F); tùy ý, trong đó CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 sự thay thế, ví dụ, thay thế bảo toàn.

Theo cách khác, khi CDR được trình bày theo quy ước Abm, tốt hơn là chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm các CDR sau:

- CDR1 (theo Abm) là trình tự axit amin GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); và
- CDR2 (theo Abm) là trình tự axit amin VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Abm) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 8, là giống như SEQ ID NO: 5; trong đó X là W hoặc F); tùy ý, trong đó CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 sự thay thế, ví dụ, thay thế bảo toàn..

Chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế, ngoài CDR1, CDR2 và CDR3 nêu ở trên, tốt hơn là còn có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ, 100%) (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) khi tiến hành so sánh bằng thuật toán BLAST, trong đó các thông số của thuật toán được lựa chọn để tạo ra sự phù hợp lớn nhất giữa các trình tự tương ứng theo toàn bộ chiều dài của các trình tự đối chứng tương ứng (ví dụ, ngưỡng dự tính: 10; cỡ chữ: 3; sự phù hợp tối đa trong khoảng nghi ngờ: 0; ma trận BLOSUM 62; đánh giá khoảng trống: hiện có 11, mở rộng 1; điều chỉnh ma trận điểm tổng hợp quy định); và/hoặc
- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR

nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR; không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt và không tính đến các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan).

Các tài liệu tham khảo sau liên quan đến thuật toán BLAST thường được sử dụng để phân tích trình tự: BLAST ALGORITHMS: Altschul *et al.* (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S.F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; và Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

Đối với các khía cạnh khác nhau và các phương án được ưu tiên của chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế, khi chất gắn kết đạt đến toàn bộ độ đồng nhất trình tự đối với SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và/hoặc số lượng và loại "khác

biệt axit amin" có thể có mặt trong chất gắn kết này theo sáng chế (nghĩa là, so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2), cần lưu ý là, trừ khi có quy định khác, khi nói rằng

(i) trình tự axit amin theo sáng chế có độ đồng nhất trình tự với trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự); và/hoặc khi nói rằng

(ii) trình tự axit amin theo sáng chế có không nhiều hơn 7, tốt hơn là không nhiều hơn 5, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" với trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (hơn nữa, không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt và không tính đến các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan),

thì chất gắn kết còn bao gồm trình tự mà không có sự khác biệt axit amin với trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 không phải các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 (như được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan) và phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt.

Do đó, theo một khía cạnh cụ thể của sáng chế, chất gắn kết PD1 theo sáng chế chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, nhưng với ít nhất một đột biến axit amin ở vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112, có thể có 100% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của nó tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, nhưng không tính đến (các) đột biến hoặc tổ hợp các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 bộc lộ ở đây và/hoặc phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) và/hoặc có thể không có sự khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (nghĩa là, không phải (các) đột biến hoặc tổ hợp các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 bộc lộ ở đây và phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt).

Khi có mặt sự khác biệt axit amin bất kỳ (nghĩa là, bên cạnh phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ và các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 mà được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể của sáng chế có liên quan), sự khác biệt axit amin này có thể có mặt trong CDR và/hoặc trong vùng khung, nhưng tốt hơn là chúng chỉ có mặt trong vùng khung (như được xác định theo quy ước Abm, nghĩa là không có mặt trong CDR như được xác định theo quy ước Abm), nghĩa là sao cho chất gắn kết PD1 theo sáng chế có cùng các CDR (được xác định theo quy ước Abm) như có mặt trong SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105.

Hơn nữa, khi chất gắn kết PD1 theo sáng chế theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế có một hoặc nhiều sự khác biệt axit amin với trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (bên cạnh các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 mà được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan), thì một số ví dụ cụ thể, nhưng không giới hạn về các đột biến/sự khác biệt axit amin có thể có mặt (nghĩa là, so với trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2) là, ví dụ, sự thay thế "nhân hóa"; ví dụ, tham khảo WO 09/138519 (hoặc trong phần tình trạng kỹ thuật của WO 09/138519) và WO 08/020079 (hoặc trong phần tình trạng kỹ thuật của WO 08/020079), cũng như các Bảng A-3 đến A-8 của WO 08/020079 (là các danh sách thể hiện sự thay thế nhân hóa có thể có).

Hơn nữa, khi các chất gắn kết PD-1 theo sáng chế có mặt ở và/hoặc tạo thành phần đầu tận cùng N của polypeptit, trong đó có mặt các chất gắn kết này, thì tốt hơn là chúng chứa D ở vị trí 1 (nghĩa là, đột biến E1D so với Đối chứng A). Ví dụ được ưu tiên nhưng không giới hạn về chất gắn kết PD-1 đầu tận cùng N được nêu là các SEQ ID NO: 24 hoặc 57. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polypeptit (còn được mô tả ở đây) có chất gắn kết PD-1 (còn được mô tả ở đây) ở đầu tận cùng N, trong đó chất gắn kết PD-1 này có D ở vị trí 1, và, ví dụ, là các SEQ ID NO: 24, 25, 57 hoặc 101-105.

Tương tự, khi chất gắn kết PD-1 theo sáng chế được sử dụng ở dạng đơn trị, thì tốt hơn là nó có cả phần kéo dài đầu tận cùng C X(n) như mô tả ở đây và D ở vị trí 1. Ví dụ được ưu tiên nhưng không giới hạn về chất gắn kết PD-1 đơn trị được nêu là SEQ ID NO: 40. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD-1 đơn trị theo sáng chế (còn được mô tả ở đây) có D ở vị trí 1 và phần kéo dài đầu tận cùng C X(n) (tốt

hơn là gốc Ala đơn). Theo một khía cạnh cụ thể, chất gắn kết PD-1 đơn trị này là SEQ ID NO: 40, 101 hoặc 102.

Bằng các ví dụ được ưu tiên, nhưng không giới hạn, các SEQ ID NO: 23, 24, 39, 40 và 57 là ví dụ về các chất gắn kết PD-1 theo sáng chế có sự khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như A14P, A74S và/hoặc K83R (ngoài ra, như được chỉ ra ở các đoạn trước đó, các SEQ ID NO: 24 và 40 và 57 cũng có đột biến E1D). Do đó, theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD-1 theo sáng chế (nghĩa là, có các đột biến ở các vị trí 11, 89, 110 và/hoặc 112 như mô tả ở đây và còn đang được mô tả tiếp ở đây) mà ít nhất là có tổ hợp thích hợp của đột biến E1D tùy ý, đột biến A14P, đột biến A74S, đột biến K83R và/hoặc đột biến I89L và, tốt hơn là, tổ hợp thích hợp của hai đột biến bất kỳ, như tất cả các đột biến này.

Chất gắn kết PD1 theo sáng chế, khi chúng được sử dụng ở dạng đơn trị và/hoặc khi chúng có mặt ở và/hoặc tạo thành đầu tận cùng C của polypeptit trong đó chúng có mặt (hoặc mặt khác khi chúng có đầu tận cùng C "lộ ra" trong polypeptit này mà thường được hiểu là đầu tận cùng C của ISVD không kết hợp với hoặc liên kết với miền ổn định (như miền CH1)); (xem WO 12/175741 và PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325)), tốt hơn là còn có phần kéo dài đầu tận cùng C của công thức $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn từ các gốc axit amin có trong tự nhiên (mặc dù theo một khía cạnh được ưu tiên, nó không bao gồm các gốc xystein bất kỳ), và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I).

Theo một số ví dụ được ưu tiên, nhưng không giới hạn về phần kéo dài đầu tận cùng C $X_{(n)}$, X và n có thể là như sau:

(a) n = 1 và X = Ala;

(b) n = 2 và mỗi X = Ala;

(c) n = 3 và mỗi X = Ala;

(d) n = 2 và ít nhất một X = Ala (với (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ nhưng tốt hơn là độc lập được chọn từ Val, Leu và/hoặc Ile);

(e) n = 3 và ít nhất một X = Ala (với (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ nhưng tốt hơn là độc lập được chọn từ Val, Leu và/hoặc Ile);

(f) n = 3 và ít nhất hai X = Ala (với (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ nhưng tốt hơn là độc lập được chọn từ Val, Leu và/hoặc Ile);

(g) n = 1 và X = Gly;

(h) n = 2 và mỗi X = Gly;

(i) n = 3 và mỗi X = Gly;

(j) n = 2 và ít nhất một X = Gly (với (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ nhưng tốt hơn là độc lập được chọn từ Val, Leu và/hoặc Ile);

(k) n = 3 và ít nhất một X = Gly (với (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ nhưng tốt hơn là độc lập được chọn từ Val, Leu và/hoặc Ile);

(l) n = 3 và ít nhất hai X = Gly (với (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ nhưng tốt hơn là độc lập được chọn từ Val, Leu và/hoặc Ile);

(m) n = 2 và mỗi X = Ala hoặc Gly;

(n) n = 3 và mỗi X = Ala hoặc Gly;

(o) n = 3 và ít nhất một X = Ala hoặc Gly (với (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ nhưng tốt hơn là độc lập được chọn từ Val, Leu và/hoặc Ile); hoặc

(p) n = 3 và ít nhất hai X = Ala hoặc Gly (với (các) gốc axit amin còn lại X độc lập được chọn từ axit amin có trong tự nhiên bất kỳ nhưng tốt hơn là độc lập được chọn từ Val, Leu và/hoặc Ile);

với các khía cạnh (a), (b), (c), (g), (h), (i), (m) và (n) được đặc biệt ưu tiên, với các khía cạnh trong đó n =1 hoặc 2 được ưu tiên và các khía cạnh trong đó n = 1 được đặc biệt ưu tiên.

Cần lưu ý rằng, tốt hơn là, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có mặt trong chất gắn kết PD1 theo sáng chế không chứa gốc xystein (tự do) (trừ khi gốc xystein này được sử dụng hoặc dự tính cho việc chức năng hóa tiếp, ví dụ để PEGyl hóa).

Một số ví dụ cụ thể, nhưng không giới hạn về phần kéo dài đầu tận cùng C hữu dụng là các trình tự axit amin sau: A, AA, AAA, G, GG, GGG, AG, GA, AAG, AGG, AGA, GGA, GAA hoặc GAG.

Khi chất gắn kết PD1 theo sáng chế chứa các đột biến ở các vị trí 110 hoặc 112 (tùy ý kết hợp với các đột biến ở vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89 và/hoặc 100a như mô tả ở đây), các gốc axit amin đầu tận cùng C của khung 4 (bắt đầu từ vị trí 109) có thể, theo một phương án của sáng chế, là như được nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 100, 101, 103, 104, 105, 106 hoặc 107 nhưng trong đó 5 gốc đầu tận cùng C có thể được thế như sau:

(i) nếu không có mặt phần kéo dài đầu tận cùng C: VTVKS (SEQ ID NO: 42), VTVQS (SEQ ID NO: 43), VKVSS (SEQ ID NO: 44) hoặc VQVSS (SEQ ID NO: 45); hoặc

(ii) nếu có mặt phần kéo dài đầu tận cùng C: $VTVKSX_{(n)}$ (SEQ ID NO: 46), VTVQSX(n) (SEQ ID NO: 47), VKVSSX(n) (SEQ ID NO: 48) hoặc $VQVSSX_{(n)}$ (SEQ ID NO: 49), như VTVKSA (SEQ ID NO: 50), VTVQSA (SEQ ID NO: 51), VKVSSA (SEQ ID NO: 52) hoặc VQVSSA (SEQ ID NO: 53).

Khi chất gắn kết PD1 theo sáng chế chứa hoặc, theo cách khác, không chứa các đột biến ở các vị trí 110 hoặc 112 (nhưng chỉ các đột biến ở vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89 và/hoặc 100a như mô tả ở đây), các gốc axit amin đầu tận cùng C của khung 4 (bắt đầu từ vị trí 109) có thể, theo một phương án của sáng chế, là như được nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 nhưng trong đó 5 gốc đầu tận cùng C có thể được thế như sau:

(i) nếu không có mặt phần kéo dài đầu tận cùng C: VTVSS (SEQ ID NO: 54) (như trong trình tự của SEQ ID NO: 1 hoặc 2); hoặc

(ii) nếu có mặt phần kéo dài đầu tận cùng C: $VTVSSX_{(n)}$ (SEQ ID NO: 55) như VTVSSA (SEQ ID NO: 56). Trong các trình tự đầu tận cùng C này, X và n như được xác định ở đây đối với phần kéo dài đầu tận cùng C.

Một số ví dụ được ưu tiên nhưng không giới hạn về chất gắn kết PD1 theo sáng chế được nêu trong các SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 và mỗi trình tự này tạo thành một khía cạnh khác theo sáng chế. Trong số đó, các chất gắn kết PD1 của các SEQ ID NO: 9-24, 57, 98, 99, 103, 104 và 105 không có phần kéo dài đầu tận cùng C, và các chất gắn kết PD1 của các SEQ ID NO: 25-40, 101 và 102 chứa alanin đầu tận cùng C (là ví dụ được ưu tiên nhưng không giới hạn ở phần kéo dài đầu tận cùng C như mô tả ở đây).

Ví dụ về chất gắn kết PD1 theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23, 24, 39 , 40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105.

Do đó, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm:

- CDR1 (theo Kabat) là trình tự axit amin IHAMG (SEQ ID NO: 3); và
- CDR2 (theo Kabat) là trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Kabat) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

và còn có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ, 100%) (trong đó CDR của nó, tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I);

trong đó, theo một phương án của sáng chế:

- gốc axit amin ở vị trí 1 là E hoặc D;
- gốc axit amin ở vị trí 11 là L hoặc V;
- gốc axit amin ở vị trí 14 là A hoặc P;
- gốc axit amin ở vị trí 52a là W hoặc V;
- gốc axit amin ở vị trí 73 là N, S, P hoặc Q;
- gốc axit amin ở vị trí 74 là A hoặc S;
- gốc axit amin ở vị trí 83 là K hoặc R;
- gốc axit amin ở vị trí 89 là T, V, I hoặc L;
- gốc axit amin ở vị trí 100a là W hoặc F;
- gốc axit amin ở vị trí 110 là T, K hoặc Q; và
- gốc axit amin ở vị trí 112 là S, K hoặc Q;

ví dụ, trong đó chất gắn kết PD1 bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau:

(i) vị trí 1 là E hoặc D;

(ii) vị trí 11 là V;

(iii) vị trí 14 là P;

(iv) vị trí 52a là V;

(v) vị trí 73 là S, P hoặc Q;

(vi) vị trí 74 là S;

(vii) vị trí 83 là R;

(viii) vị trí 89 là L;

(ix) vị trí 100a là F;

ví dụ, bao gồm tập hợp các đột biến sau:

a. vị trí 1 là D hoặc E, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 74 là S, vị trí 83 là R và vị trí 89 là L;

b. vị trí 1 là D hoặc E, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 52a là V; vị trí 73 là S, P hoặc Q; vị trí 74 là S, vị trí 83 là R, vị trí 89 là L và vị trí 100a là F;

c. vị trí 1 là D hoặc E, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 74 là S, vị trí 83 là R và vị trí 89 là L;

d. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V;

e. vị trí 89 là L và vị trí 110 là K hoặc Q;

f. vị trí 89 là L và vị trí 112 là K hoặc Q;

g. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V và vị trí 110 là K hoặc Q;

h. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V và vị trí 112 là K hoặc Q;

i. 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và 100aF, và tùy ý, 1D hoặc 1E; hoặc kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L và tùy ý, 1D hoặc 1E;

j. 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và 100a F và, tùy ý, 1D hoặc 1E; hoặc kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L và tùy ý, 1D hoặc 1E;

k. vị trí 11 là V và vị trí 110 là K hoặc Q; hoặc

l. vị trí 11 là V và vị trí 112 là K hoặc Q.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) có:

- CDR1 (theo Kabat) là trình tự axit amin IHAMG (SEQ ID NO: 3); và

- CDR2 (theo Kabat) là trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Kabat) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

và còn có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR của nó, tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ, 100%) (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I);

chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm, theo một phương án của sáng chế, một hoặc nhiều gốc axit amin sau (nghĩa là, các đột biến so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 1D hoặc 1E;
- 11V;
- 14P;
- 52aV;
- 73Q, 73P hoặc 73S;
- 74S;
- 83R;
- 89T hoặc 89L; hoặc
- 100aF;

ví dụ, bao gồm tập hợp các đột biến sau:

- 1D hoặc 1E kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 100aF;
- 1D hoặc 1E kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R và/hoặc 89L;
- 89L kết hợp với 11V;
- 89L kết hợp với 110K hoặc 110Q;
- 89L kết hợp với 112K hoặc 112Q;
- 89L kết hợp với 11V, 14P,74S, 83R và 1D và 1E;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 100aF và 1D hoặc 1E;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 100aF và 1D hoặc 1E;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 89L kết hợp với 11V và 110K hoặc 110Q;
- 89L kết hợp với 11V và 112K hoặc 112Q;
- 11V kết hợp với 110K hoặc 110Q; hoặc
- 11V kết hợp với 112K hoặc 112Q.

Như đã nêu, khi chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế được sử dụng ở dạng đơn trị và/hoặc có mặt ở đầu tận cùng C của polypeptit

(như được xác định ở đây), chất gắn kết PD1 tốt hơn là có phần kéo dài đầu tận cùng C X(n), phần kéo dài đầu tận cùng C có thể được mô tả ở đây đối với chất gắn kết PD1 theo sáng chế và/hoặc như được mô tả trong WO 12/175741 hoặc PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Một số ví dụ được ưu tiên, nhưng không giới hạn về chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế được nêu trong các SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 và 105 và mỗi trình tự axit amin riêng rẽ này tạo thành một khía cạnh khác của sáng chế.

Như đã nêu, sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 nhưng trong đó vị trí 89 là T; hoặc trong đó vị trí 1 là E hoặc D, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 52a là V, vị trí 73 là P, S hoặc Q, vị trí 74 là S, vị trí 83 là R, vị trí 89 là L và/hoặc vị trí 100a là F; hoặc trong đó vị trí 11 là V và vị trí 89 là L (tùy ý kết hợp phù hợp với đột biến 110K hoặc 110Q và/hoặc đột biến 112K hoặc 112Q, và cụ thể là kết hợp với đột biến 110K hoặc 110Q). Theo một phương án của sáng chế, các trình tự axit amin trong đó vị trí 11 là V và vị trí 89 là L, tùy ý với đột biến 110K hoặc 110Q.

Do đó, theo một khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) như kháng thể miền đơn) có:

- CDR1 (theo Kabat) là trình tự axit amin IHAMG (SEQ ID NO: 3); và
- CDR2 (theo Kabat) là trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Kabat) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

và còn có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR của nó, tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ, 100%) (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng

như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I);

trong đó, theo một phương án của sáng chế:

- axit amin ở vị trí 1 là E hoặc D;
- axit amin ở vị trí 11 là L hoặc V;
- axit amin ở vị trí 14 là A hoặc P;
- axit amin ở vị trí 52a là W hoặc V;
- axit amin ở vị trí 73 là N, S, P hoặc Q;
- axit amin ở vị trí 74 là A hoặc S;
- axit amin ở vị trí 83 là K hoặc R;
- axit amin ở vị trí 89 là I, T hoặc L;
- axit amin ở vị trí 100a là W hoặc F;
- gốc axit amin ở vị trí 110 là T, K hoặc Q (và tốt hơn là T); và
- gốc axit amin ở vị trí 112 là S, K hoặc Q (và tốt hơn là S).

Theo khía cạnh được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) như kháng thể miền đơn) có:

- CDR1 (theo Kabat) là trình tự axit amin IHAMG (SEQ ID NO: 3); và
- CDR2 (theo Kabat) là trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Kabat) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

và có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR của nó, tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ, 100%) (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I);

trong đó một hoặc nhiều vị trí sau là đúng:

- axit amin ở vị trí 1 là E hoặc D;
- axit amin ở vị trí 11 là L hoặc V;
- axit amin ở vị trí 14 là A hoặc P;
- axit amin ở vị trí 52a là W hoặc V;
- axit amin ở vị trí 73 là S, P, N hoặc Q;
- axit amin ở vị trí 74 là A hoặc S;
- axit amin ở vị trí 83 là K hoặc R;
- axit amin ở vị trí 89 là I, T hoặc L;
- axit amin ở vị trí 100a là W hoặc F;
- gốc axit amin ở vị trí 110 là T, K hoặc Q (và tốt hơn là T); hoặc
- gốc axit amin ở vị trí 112 là S, K hoặc Q (và tốt hơn là S).

Theo một khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin sau (nghĩa là, các đột biến so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 11V kết hợp với 89L;
- 11V kết hợp với 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 100aF và, tùy ý, 1D;
- 11V kết hợp với 14P, 74S, 83R, 89L và 1D hoặc 1E;
- 11V kết hợp với 110K hoặc 110Q;
- 11V kết hợp với 112K hoặc 112Q;
- 11V kết hợp với 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF, 110K hoặc 110Q và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 11V kết hợp với 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF, 112K hoặc 112Q và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 11V kết hợp với 89L và 110K hoặc 110Q;
- 11V kết hợp với 89L và 112K hoặc 112Q; hoặc

- 11V kết hợp với 1D hoặc 1E, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 100aF;

và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Kabat) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin sau (nghĩa là, các đột biến so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 89L kết hợp với 11V;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 89L kết hợp với 110K hoặc 110Q;
- 89L kết hợp với 112K hoặc 112Q;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF, 110K hoặc 110Q và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF, 112K hoặc 112Q và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 110K hoặc 110Q và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 112K hoặc 112Q và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 89L kết hợp với 11V và 110K hoặc 110Q; hoặc
- 89L kết hợp với 11V và 112K hoặc 112Q;

và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Kabat) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin sau (nghĩa

là, các đột biến so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 110K hoặc 110Q kết hợp với 1D;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 1E;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 14P;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 52aV;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 73S hoặc 73Q hoặc 73P;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 74S;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 83R;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 89L;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 100aF;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 89L; hoặc
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V và 89L;

và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Kabat) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin sau (nghĩa là, các đột biến so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 112K hoặc 112Q kết hợp với 1D hoặc 1E;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 14P;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 52aV;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 73S hoặc 73Q hoặc 73P;

- 112K hoặc 112Q kết hợp với 74S;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 83R;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 89L;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 100aF;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF và/hoặc 1D hoặc 1E;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L và/hoặc 1D hoặc 1E; hoặc
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V và 89L;

và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Kabat) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm T ở vị trí 89 và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Kabat) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm V ở vị trí 11 và L ở vị trí 89 và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 9-40, 57, 100, 101, 102 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Kabat) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Như đã nêu, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo các khía cạnh nêu trên của sáng chế tốt hơn là còn chứa tổ hợp thích hợp của đột biến A14P, đột biến A74S và/hoặc đột biến K83R, và tốt hơn là tổ hợp thích hợp của hai đột biến bất kỳ, như tất cả ba đột biến này (ví dụ, E1D (tùy ý), L11V, A14P, W52aV, N73S hoặc N73Q hoặc N73P, A74S, K83R, I89L và W100aF). Khi chất gắn kết LAG3 hoặc HSA có mặt ở đầu tận cùng N của chất gắn kết PD1 theo sáng chế, nhóm gắn kết đầu tận cùng N tốt hơn là có đột biến E1D.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) như kháng thể miền đơn) có:

- CDR1 (theo Abm) là trình tự axit amin GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); và
- CDR2 (theo Abm) là trình tự axit amin VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Abm) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

và còn có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR, tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ, 100%) (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I);

trong đó, theo một phương án của sáng chế:

- axit amin ở vị trí 1 là E hoặc D;
- axit amin ở vị trí 11 là L hoặc V;
- axit amin ở vị trí 14 là A hoặc P;
- axit amin ở vị trí 52a là W hoặc V;
- axit amin ở vị trí 73 là N, S, P hoặc Q;
- axit amin ở vị trí 74 là A hoặc S;
- axit amin ở vị trí 83 là K hoặc R;
- axit amin ở vị trí 89 là V, I, T hoặc L;
- gốc axit amin ở vị trí 89 là T;
- axit amin ở vị trí 100a là W và F;
- gốc axit amin ở vị trí 110 là T, K hoặc Q (và tốt hơn là T); và
- gốc axit amin ở vị trí 112 là S, K hoặc Q (và tốt hơn là S)

ví dụ, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau:

(i) vị trí 1 là D hoặc E;

(ii) vị trí 11 là V;

(iii) vị trí 14 là P;

(iv) vị trí 52a là V;

(v) vị trí 73 là Q, P hoặc S;

(vi) vị trí 74 là S;

(vii) vị trí 83 là R;

(viii) vị trí 89 là L hoặc T;

(ix) vị trí 100a là F;

ví dụ, bao gồm tập hợp các đột biến sau:

a. vị trí 11 là V; vị trí 14 là P; vị trí 52a là V; vị trí 73 là P, S hoặc Q; vị trí 74 là S; vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; vị trí 100a là F; và, tùy ý, vị trí 1 là E hoặc D;

b. vị trí 11 là V; vị trí 14 là P; vị trí 74 là S; vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; và, tùy ý, vị trí 1 là E hoặc D;

c. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V;

d. vị trí 89 là L và vị trí 110 là K hoặc Q;

e. vị trí 89 là L và vị trí 112 là K hoặc Q;

f. vị trí 11 là V; vị trí 14 là P; vị trí 52a là V; vị trí 73 là P, S hoặc Q; vị trí 74 là S; vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; vị trí 100a là F; vị trí 110 là K hoặc Q và, tùy ý, vị trí 1 là E hoặc D;

g. vị trí 11 là V; vị trí 14 là P; vị trí 52a là V; vị trí 73 là S, P hoặc Q; vị trí 74 là S; vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; vị trí 100a là F; vị trí 112 là K hoặc Q và, tùy ý, vị trí 1 là E hoặc D;

h. vị trí 11 là V; vị trí 14 là P; vị trí 74 là S; vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; vị trí 110 là K hoặc Q và, tùy ý, vị trí 1 là E hoặc D;

i. vị trí 11 là V; vị trí 14 là P; vị trí 74 là S; vị trí 83 là R; vị trí 89 là L; vị trí 112 là K hoặc Q và, tùy ý, vị trí 1 là E hoặc D;

j. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V và vị trí 110 là K hoặc Q;

k. vị trí 89 là L và vị trí 11 là V và vị trí 112 là K hoặc Q;

l. vị trí 11 là V và vị trí 110 là K hoặc Q; hoặc

m. vị trí 11 là V và vị trí 112 là K hoặc Q.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) như kháng thể miền đơn) có:

- CDR1 (theo Abm) là trình tự axit amin GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); và
- CDR2 (theo Abm) là trình tự axit amin VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Abm) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

và còn có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR, tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ,

100%) (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I);

miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin sau (nghĩa là, các đột biến so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 1D hoặc 1E;
- 11V;
- 14P;
- 52aV;
- 73Q, 73S hoặc 73P;
- 74S;
- 83R;
- 89L hoặc 89T; hoặc
- 100aF;

ví dụ, bao gồm tập hợp các đột biến sau:

- 89T hoặc 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF hoặc 1E hoặc 1D;
- 89T hoặc 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, hoặc 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V;
- 89L kết hợp với 110K hoặc 110Q;
- 89L kết hợp với 112K hoặc 112Q;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 110K hoặc 110Q hoặc 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 112K hoặc 112Q hoặc 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF, 110K hoặc 110Q hoặc 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF, 112K hoặc 112Q hoặc 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V và 110K hoặc 110Q;
- 89L kết hợp với 11V và 112K hoặc 112Q;
- 11V kết hợp với 110K hoặc 110Q; hoặc
- 11V kết hợp với 112K hoặc 112Q.

Như đã nêu, khi chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế được sử dụng ở dạng đơn trị và/hoặc trong đó nhóm mà gắn kết với PD1 có mặt ở đầu tận cùng C của polypeptit (như được xác định ở đây), nhóm gắn kết PD1 tốt hơn là có phần kéo dài đầu tận cùng C X(n), phần kéo dài đầu tận cùng C có thể được mô tả ở đây đối với chất gắn kết PD1 theo sáng chế và/hoặc như được mô tả trong WO 12/175741 hoặc PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Một số ví dụ được ưu tiên, nhưng không giới hạn về chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế được nêu trong các SEQ ID NO: 9 đến 40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 và mỗi trình tự axit amin riêng rẽ này tạo thành một khía cạnh khác của sáng chế.

Như đã nêu, trong sáng chế, các trình tự axit amin trong đó vị trí 89 là T; hoặc trong đó trong đó vị trí 1 là E hoặc D, vị trí 11 là V, vị trí 14 là P, vị trí 52a là V, vị trí

73 là P, S hoặc Q, vị trí 74 là S, vị trí 83 là R, vị trí 89 là L và/hoặc vị trí 100a là F; hoặc trong đó vị trí 11 là V và vị trí 89 là L (tùy ý kết hợp phù hợp với đột biến 110K hoặc 110Q và/hoặc đột biến 112K hoặc 112Q, và cụ thể là kết hợp với đột biến 110K hoặc 110Q) là một phần của sáng chế. Theo một phương án của sáng chế, trình tự axit amin ở vị trí 11 là V và vị trí 89 là L, tùy ý với đột biến 110K hoặc 110Q.

Do đó, theo một khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) như kháng thể miền đơn) có:

- CDR1 (theo Abm) là trình tự axit amin GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); và
- CDR2 (theo Abm) là trình tự axit amin VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Abm) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

và còn có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR, tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ, 100%) (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I);

trong đó, theo một phương án của sáng chế:

- gốc axit amin ở vị trí 1 là E hoặc D;
- gốc axit amin ở vị trí 11 là L hoặc V;
- gốc axit amin ở vị trí 14 là A hoặc P;
- gốc axit amin ở vị trí 52a là W hoặc V;
- gốc axit amin ở vị trí 73 là S, P, N hoặc Q;
- gốc axit amin ở vị trí 74 là A hoặc S;
- gốc axit amin ở vị trí 83 là K hoặc R;
- gốc axit amin ở vị trí 89 là T, L hoặc I;
- gốc axit amin ở vị trí 100a là W hoặc F;
- gốc axit amin ở vị trí 110 là T, K hoặc Q (và tốt hơn là T); và
- gốc axit amin ở vị trí 112 là S, K hoặc Q (và tốt hơn là S).

Theo khía cạnh được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến chất gắn kết PD1 (ví dụ, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) như kháng thể miền đơn) có:

- CDR1 (theo Abm) là trình tự axit amin GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); và
- CDR2 (theo Abm) là trình tự axit amin VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, trong đó X là W hoặc V); và
- CDR3 (theo Abm) là trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

và còn có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR, tùy ý chứa đột biến W52aV và/hoặc W100aF, không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (ví dụ,

100%) (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 được yêu cầu theo khía cạnh cụ thể có liên quan không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I);

trong đó, ví dụ, một hoặc nhiều vị trí sau là đúng:

- gốc axit amin ở vị trí 1 là E hoặc D;
- gốc axit amin ở vị trí 11 là V;
- gốc axit amin ở vị trí 14 là P;
- gốc axit amin ở vị trí 52a là V;
- gốc axit amin ở vị trí 73 là S, P hoặc Q;
- gốc axit amin ở vị trí 74 là S;
- gốc axit amin ở vị trí 83 là R;
- gốc axit amin ở vị trí 89 là L;
- gốc axit amin ở vị trí 100a là F;
- gốc axit amin ở vị trí 110 là T, K hoặc Q; hoặc
- gốc axit amin ở vị trí 112 là S, K hoặc Q.

Theo một khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm một trong số các tập hợp đột biến sau (nghĩa là, các đột biến so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 11V kết hợp với 89L;
- 11V kết hợp với 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF và 1E hoặc 1D;
- 11V kết hợp với 14P, 74S, 83R, 89L và 1E hoặc 1D;
- 11V kết hợp với 110K hoặc 110Q;
- 11V kết hợp với 112K hoặc 112Q;
- 11V kết hợp với 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF, 110K hoặc 110Q và 1E hoặc 1D;
- 11V kết hợp với 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF, 112K hoặc 112Q và 1E hoặc 1D;
- 11V kết hợp với 14P, 74S, 83R, 89L, 110K hoặc 110Q và 1E hoặc 1D;
- 11V kết hợp với 14P, 74S, 83R, 89L, 112K hoặc 112Q và 1E hoặc 1D;
- 11V kết hợp với 89L và 110K hoặc 110Q; hoặc
- 11V kết hợp với 89L và 112K hoặc 112Q;

và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Abm) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm một trong số các tập hợp đột biến sau (nghĩa là, các đột biến so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 89L kết hợp với 11V;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF và 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R và 1E hoặc 1D;

- 89L kết hợp với 110K hoặc 110Q;
- 89L kết hợp với 112K hoặc 112Q;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF, 110K hoặc 110Q và 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 100aF, 112K hoặc 112Q và 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 110K hoặc 110Q và 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 112K hoặc 112Q và 1E hoặc 1D;
- 89L kết hợp với 11V và 110K hoặc 110Q; hoặc
- 89L kết hợp với 11V và 112K hoặc 112Q;

và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Abm) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm một trong số các tập hợp đột biến sau (nghĩa là, các đột biến so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 89L;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V và 89L;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và 100aF, và 1E hoặc 1D;
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L và 1D; hoặc
- 110K hoặc 110Q kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L, và 1E,

và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Abm) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều tập hợp đột biến sau

(nghĩa là, các đột biến so với trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2) ở các vị trí được nêu (đánh số theo Kabat):

- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 89L;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V và 89L;
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V, 14P, 52aV, 73S hoặc 73Q hoặc 73P, 74S, 83R, 89L và 100aF, và 1E hoặc 1D; hoặc
- 112K hoặc 112Q kết hợp với 11V, 14P, 74S, 83R, 89L, và 1E hoặc 1D;

và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Abm) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm T hoặc L ở vị trí 89 và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Abm) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác, chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế bao gồm V ở vị trí 11 và L ở vị trí 89 và có CDR là giống như CDR có mặt trong trình tự của SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 hoặc 105 (ví dụ, theo Abm) và có toàn bộ độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 như được mô tả ở đây.

Như đã nêu, chất gắn kết PD-1 theo các khía cạnh nêu trên của sáng chế tốt hơn là còn chứa tổ hợp thích hợp của đột biến E1D, đột biến L11V, đột biến A14P, đột biến W52aV, đột biến N73S hoặc N73Q hoặc N73P, đột biến A74S, đột biến K83R, đột biến I89L và/hoặc đột biến W100aF, và tốt hơn là tổ hợp thích hợp của hai đột biến bất kỳ, như tất cả các đột biến này. Khi chất gắn kết PD-1 là đơn trị hoặc trong đó nhóm gắn kết PD1 của nó có mặt ở đầu tận cùng N của polypeptit, tốt hơn là còn có đột biến E1D.

Theo khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn khác, sáng chế đề cập đến miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin được

chọn từ một trong số các trình tự axit amin sau: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, hoặc SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 hoặc SEQ ID NO: 105.

Theo khía cạnh cụ thể, nhưng không giới hạn khác, sáng chế đề cập đến miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch là hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin được chọn từ một trong số các trình tự axit amin sau: SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO: 104 và SEQ ID NO: 105.

Hơn nữa, như đã chỉ ra ở đây, các gốc axit amin của chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) được đánh số theo cách đánh số chung đối với VH bởi Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91), được áp dụng cho các miền VHH của lạc đà trong tài liệu Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-195; hoặc được nêu ở đây. Cần lưu ý là, như đã biết rõ trong tình trạng kỹ thuật đối với miền VH và đối với miền VHH, tổng số gốc axit amin trong mỗi CDR có thể thay đổi và có thể không tương ứng với tổng số gốc axit amin được biểu thị bằng cách đánh số Kabat (nghĩa là, một hoặc nhiều vị trí theo cách đánh số Kabat có thể không bị chiếm giữ trong trình tự thực tế, hoặc trình tự thực tế có thể chứa nhiều gốc axit amin hơn số gốc cho phép theo cách đánh số Kabat). Nghĩa là, nói chung, cách đánh số theo Kabat có thể hoặc không thể tương ứng với cách đánh số thực tế của các gốc axit amin trong trình tự thực tế. Nói chung, tuy nhiên, theo cách đánh số Kabat và không kể số gốc axit amin trong CDR, vị trí 1 theo cách đánh số Kabat tương ứng với lúc bắt đầu của FR1 và ngược lại, vị trí 36 theo cách đánh số Kabat tương ứng với lúc bắt đầu của FR2

và ngược lại, vị trí 66 theo cách đánh số Kabat tương ứng với lúc bắt đầu của FR3 và ngược lại, và vị trí 103 theo cách đánh số Kabat tương ứng với lúc bắt đầu của FR4 và *ngược lại.*].

Các phương pháp thay thế để đánh số các gốc axit amin của miền VH, phương pháp này cũng có thể được áp dụng theo cách tương tự với miền VHH của lạc đà và với kháng thể miền đơn, là phương pháp được mô tả bởi Chothia *et al.* (Nature 342, 877-883 (1989)), gọi là "xác định AbM" và gọi là "xác định tiếp xúc". Tuy nhiên, trong phần mô tả sáng chế, các khía cạnh và hình vẽ, cách đánh số theo Kabat của Riechmann và Muyldermans được áp dụng đối với miền VHH sẽ được chấp nhận, trừ khi có quy định khác.

Các khía cạnh, phương án, ưu điểm, áp dụng, việc sử dụng này và các khía cạnh, phương án, ưu điểm, áp dụng và việc sử dụng khác theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng nhờ phần mô tả tiếp ở đây.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polypeptit hoặc đối tượng hóa học khác mà bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm ít nhất một (như một, hai hoặc ba) các nhóm gắn kết PD1 mô tả ở đây.

Chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế có thể được dung hợp với một hoặc nhiều trình tự axit amin, đối tượng hoặc nhóm hóa học khác. Các trình tự axit amin, đối tượng hoặc nhóm hóa học khác này có thể tạo ra một hoặc nhiều tính chất mong muốn đối với chất gắn kết PD1 thu được theo sáng chế và/hoặc có thể làm thay đổi các tính chất của chất gắn kết PD1 thu được theo sáng chế theo cách mong muốn, ví dụ, tạo ra chất gắn kết PD1 thu được theo sáng chế có hoạt tính sinh học và/hoặc điều trị mong muốn (ví dụ, tạo ra chất gắn kết PD1 thu được theo sáng chế có ái lực và tốt hơn là hiệu lực chống lại đích thích hợp về mặt điều trị khác sao cho polypeptit thu được trở thành "đặc hiệu kép" đối với PD1 và đích thích hợp về mặt điều trị khác như CTLA4, LAG3, BTLA hoặc CD27), tạo ra thời gian bán thải mong muốn và/hoặc mặt khác, làm biến đổi hoặc cải thiện tính chất dược động học và/hoặc dược lực học, tạo đích chất gắn kết PD1 với các tế bào đặc hiệu, mô hoặc cơ quan cụ thể (bao gồm tế bào ung thư và mô bệnh ung thư), tạo ra tác động gây độc tế bào và/hoặc dùng làm

thẻ hoặc nhãn phát hiện được. Một số ví dụ không giới hạn về các trình tự axit amin, đối tượng hoặc nhóm hóa học khác này là:

- một hoặc nhiều thành phần liên kết thích hợp (như thành phần liên kết 9GS, 15GS hoặc 35GS (tổ hợp bất kỳ của 9, 15, 20 hoặc 35 axit amin G và S như, ví dụ, GGGGSGGGS (thành phần liên kết 9GS; SEQ ID NO: 125), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (thành phần liên kết 20GS; SEQ ID NO: 100) hoặc GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (thành phần liên kết 35GS; SEQ ID NO: 58)) hoặc (GGGS)n trong đó n là 1, 2, 3 ,4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10); và/hoặc
- một hoặc nhiều nhóm gắn kết, miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết mà hướng đến chống lại đích thích hợp về mặt điều trị không phải PD1 (nghĩa là, sao cho tạo ra chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế mà đặc hiệu kép đối với cả PD1 và đích khác thích hợp về mặt điều trị khác, ví dụ, chống lại epitop khác nhau của PD1, CD27, LAG3, CTLA4, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2 CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17, TSLP); và/hoặc
- một hoặc nhiều miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết mà tạo ra để làm tăng thời gian bán thải (ví dụ, miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết mà có thể gắn kết chống lại protein huyết thanh như albumin huyết thanh, ví dụ, albumin huyết thanh người), ví dụ, ALB11002; và/hoặc
- một hoặc nhiều miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết mà tạo đích chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) đến tế bào, mô hoặc cơ quan mong muốn (như tế bào ung thư); và/hoặc
- một hoặc nhiều miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết mà tạo ra tính đặc hiệu tăng chống lại PD1 (thông thường, có khả năng gắn kết với PD1 nhưng nói chung bản thân chúng về cơ bản không có chức năng chống lại PD1); và/hoặc

- miền gắn kết, đơn vị gắn kết hoặc đối tượng hóa học khác mà đối với chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) được đưa vào tế bào mong muốn (ví dụ, kháng thể kháng EGFR như được mô tả trong WO 05/044858); và/hoặc
- nhóm làm cải thiện thời gian bán thải như nhóm polyetylenglycol thích hợp (nghĩa là, PEGyl hóa) hoặc trình tự axit amin mà tạo ra thời gian bán thải tăng như albumin huyết thanh người hoặc mảnh thích hợp của nó (nghĩa là, dung hợp albumin) hoặc, ví dụ, peptit gắn kết albumin huyết thanh như được mô tả trong WO 2008/068280; và/hoặc
- hợp phần tải thuốc như hợp phần tải thuốc gây độc tế bào; và/hoặc
- chất đánh dấu hoặc thẻ phát hiện được, như chất đánh dấu phóng xạ hoặc chất đánh dấu huỳnh quang; và/hoặc
- thẻ mà có thể giúp cố định, phát hiện và/hoặc tinh chế chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn), như HIS (ví dụ, HHHHHH; SEQ ID NO: 93 hoặc HHHHHHHHHHHHHHHHHH; SEQ ID NO: 94) hoặc thẻ FLAG (DYKDDDK (SEQ ID NO: 95)) (ví dụ, $FLAG_3$); và/hoặc
- thẻ mà có thể được chức hóa, như thẻ GGC đầu tận cùng C hoặc GGGC; và/hoặc
- phần kéo dài đầu tận cùng C X(n) (ví dụ, -Ala), có thể còn được mô tả ở đây đối với chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế và/hoặc như được mô tả trong WO 12/175741 hoặc PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Phạm vi theo sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) bao gồm một hoặc nhiều phần hoặc mảnh của kháng thể (tốt hơn là người) (như phần Fc hoặc mảnh chức năng của nó hoặc một hoặc nhiều miền ổn định) và/hoặc từ kháng thể chỉ có chuỗi nặng của lạc đà (như một hoặc nhiều miền ổn định).

Chất gắn kết LAG3

Sáng chế đề xuất chất gắn kết LAG3 được cải thiện, ví dụ, ISVD kháng LAG3 được cải thiện và cụ thể hơn là kháng thể miền đơn LAG3 được cải thiện, ví dụ, 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L); F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L); F0237611B09

(E1D,L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A; hoặc F0237611B09(E1D,L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A.

Như đã bàn luận, "chất gắn kết LAG3" theo sáng chế là phân tử bất kỳ mô tả ở đây mà gắn kết với LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) cũng như chất gắn kết đa hóa trị hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, chất gắn kết PD1/LAG3) bao gồm phân tử được dung hợp với chất gắn kết khác. Ví dụ, chất gắn kết LAG3 có thể bao gồm nhóm gắn kết LAG3 dung hợp với nhóm mà gắn kết với PD1, CD27, CTLA4, HSA, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2 CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17, TSLP. Chất gắn kết LAG3 riêng rẽ có thể được đề cập đến là nhóm gắn kết LAG3 nếu nó là một phần của phân tử lớn hơn, ví dụ, phân tử đa hóa trị, trong đó nhóm gắn kết LAG3 được dung hợp với nhóm gắn kết khác, như F023700924 hoặc F023700931.

Chất gắn kết LAG3 theo sáng chế bao gồm polypeptit là các biến thể của polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63 nhưng đột biến ở vị trí 1, 11, 14, 41 43, 62, 74, 83 và/hoặc 89.

Như được mô tả tiếp ở đây, chất gắn kết LAG3 theo sáng chế tốt hơn là có cùng tổ hợp CDRs (nghĩa là, CDR1, CDR2 và CDR3) như có mặt trong 11B09 hoặc trong chất gắn kết chứa trình tự của 11B09 (SEQ ID NO: 63). Xem bảng B-1.

Sáng chế còn bao gồm chất gắn kết LAG3 là các biến thể của 11B09 mà chứa trình tự axit amin như nêu trong Bảng B-2 dưới đây. Phạm vi theo sáng chế bao gồm chất gắn kết LAG3 bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của các biến thể nêu dưới đây trong Bảng B-2.

Ngoài ra, sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1/LAG3 bao gồm nhóm gắn kết LAG3 bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 hoặc trình tự axit amin của 11B09 hoặc của một trong số các biến thể nêu dưới đây trong Bảng B-2.

Bảng B-1. Chất gắn kết LAG3 11B09.

Mô tả	Trình tự
11B09 (ở đây có thể được gọi là "F0237611B09" hoặc "611B09") SEQ ID NO: 63	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQARGNE REFVA**AISESGGRTH**YADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPE DTAVYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVTVSS

Bảng B-2. Chất gắn kết LAG3 11B09 được tối ưu hóa trình tự

Mô tả	Trình tự
11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) Tên: F023700842 SEQ ID NO: 64	EVQLVE SGGGVVQPGG SLRLSCAASG **RTFSDYVMG**W FRQAPGKERE FVA**AISESGG RTH**YADSVKG RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RPEDTALYYC AT**TLLWWTSE YAPIKANDYD Y**WGQGTLVTV SS
CDR1 (SEQ ID NO: 65)	**GRTFSDYVMG** hoặc **DYVMG**
CDR2 (SEQ ID NO: 66)	**AISESGGRTH** hoặc **AISESGGRTH**YADXVKG; trong đó X là A hoặc S (ví dụ, AISESGGRTHYADAVKG hoặc AISESGG RTHYADSVKG)
CDR3 (SEQ ID NO: 67)	**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**
SO đơn trị (tối ưu hóa trình tự) 611B09 + ALB11002 Tên: F023701128 Mô tả: F0237611B09(E1D,L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**W FRQAPGKEREFVA**AISESGGRTH**YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPI KANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS

83R,V89L)-35GS-ALB11002-A Đích: hLAG-3 SEQ ID NO: 96	DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
SO hóa trị hai (tối ưu hóa trình tự) 611B09 + ALB11002 Tên: F023700962 Mô tả: F0237611B09 (E1D,L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A Đích: hLAG-3 SEQ ID NO: 97	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**W FRQAPGKEREFVA**AISESGGRTH**YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPI KANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESG GRTH**YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNA KTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTV SSA
Tên: F023700594 Mô tả: F0237611B09-35GS-F0237611B09-35GS-ALB11002 Đích: hLAG-3 SEQ ID NO: 127	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**W FRQARGNEREFVA**AISESGGRTH**YADAVKGRFTISRD NAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAT**TLLWWTSEYA PIKANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGS LRLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQARGNEREFVA**AISES GGRTH**YADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPED TAVYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS

*CDR của chất gắn kết LAG3 được gạch chân và/hoặc in đậm.

Sáng chế bao gồm các phương án trong đó chất gắn kết LAG3 theo sáng chế (ví dụ, trong chất gắn kết PD1/LAG3) bao gồm một, hai hoặc ba CDR của chất gắn kết LAG3 nêu ở trên trong Bảng B-1 hoặc B-2 (ví dụ, SEQ ID NO: 63, 64, 95, 96 hoặc 97) trong đó mỗi chất gắn kết bao gồm 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5 sự thay thế axit amin, ví dụ, thay thế bảo toàn, và/hoặc bao gồm 100, 99, 98, 97, 96 hoặc 95% độ đồng nhất trình tự so với trình tự CDR nêu trong bảng B-1 hoặc B-2 trong đó chất gắn kết LAG3 theo sáng chế có CDR giữ lại khả năng gắn kết với LAG3. Theo một phương án của sáng chế, axit amin thứ nhất của chất gắn kết LAG3 theo sáng chế là E. Theo một phương án của sáng chế, axit amin thứ nhất của chất gắn kết LAG3 theo sáng chế là E hoặc D.

Sáng chế bao gồm chất gắn kết LAG3 F023700656 (11B09 (E1D); SEQ ID NO: 63 (E1D)).

Cách đánh số gốc theo Kabat đối với một số gốc nhất định của chất gắn kết LAG3 nêu trong bảng B-1 hoặc B-2 được thể hiện theo trình tự dưới đây:
EVQLVE SGGG**V**$_{11}$VQ**P**$_{14}$GG SLRLSCAASG RTFSDYVMGW FRQA**P**$_{41}$G**K**$_{43}$ERE FVAAISESGG RTHYADS$_{62}$VKG RFTISRDNS$_{74}$K NTLYLQMNSL **R**$_{83}$PEDTA**L**$_{89}$YYC ATTLLWWTSE YAPIKANDYD YWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 64). Tùy ý, gốc 1 là D.

Sáng chế bao gồm chất gắn kết LAG3 bất kỳ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, 64 hoặc 127 (hoặc có nhóm chất gắn kết LAG3 của SEQ ID NO: 96 hoặc 97) (cũng như chất gắn kết LAG3 có đột biến E1D hoặc D1E) hoặc trình tự axit amin chứa 80% hoặc nhiều hơn (ví dụ, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%) độ đồng nhất trình tự axit amin (nghĩa là, so sánh các trình tự axit amin đầy đủ) trong đó chất gắn kết LAG3 giữ lại khả năng gắn kết với LAG3 và, tùy ý, bao gồm chất gắn kết HSA.

Sáng chế bao gồm chất gắn kết LAG3, như ISVD LAG3 (ví dụ, kháng thể miền đơn), có CDR1, CDR2 và CDR3 của chất gắn kết chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63, 64, 96, 97 hoặc 127 (hoặc biến thể của nó như mô tả ở đây), ví dụ, bao gồm các CDR sau:

- CDR1 chứa trình tự axit amin GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65); và
- CDR2 chứa trình tự axit amin AISESGGRTH (SEQ ID NO: 66); và

- CDR3 chứa trình tự axit amin TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67);

và, tùy ý, có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, 64, 96, 97 hoặc 127 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt, cũng như các đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 41 43, 62, 74, 76, 83, 89, 100 và/hoặc 105 không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (như được xác định ở đây, và không tính đến đột biến bất kỳ nêu ở đây ở (các) vị trí 1, 11, 14, 41 43, 62, 74, 76, 83, 89, 100 và/hoặc 105 có thể có mặt và không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, 64, 96, 97 hoặc 127 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C như được bàn luận ở đây, ví dụ, $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I).

Sáng chế còn bao gồm chất gắn kết LAG3 dung hợp với một hoặc nhiều chất kéo dài thời gian bán thải, như ISVD mà gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002.

Chất gắn kết đa đặc hiệu

Sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 và chất gắn kết LAG3 mà có thể được dung hợp trong phân tử đa hóa trị, đa đặc hiệu đơn mà gắn kết với PD1 và LAG3 (chất gắn kết PD1/LAG3) và, theo một phương án của sáng chế, các chất gắn kết này được liên

kết với một hoặc nhiều chất kéo dài thời gian bán thải làm tăng thời gian bán thải của chất gắn kết trong cơ thể đối tượng. Theo một phương án của sáng chế, chất kéo dài thời gian bán thải là ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn) mà gắn kết đặc hiệu với albumin huyết thanh người (HSA), ví dụ, ALB11002. Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết đa đặc hiệu là F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177 như mô tả ở đây.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1/LAG3 bao gồm:

(1) chất gắn kết PD1 bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chất gắn kết PD1 bất kỳ nêu trong bảng A-1 hoặc A-2, tùy ý, mỗi chất gắn kết độc lập bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 sự thay thế axit amin (ví dụ, đột biến bảo toàn) hoặc:

CDR1 chứa trình tự axit amin IHAMG (SEQ ID NO: 3) hoặc GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6);

CDR2 chứa trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V, ví dụ, W) hoặc VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7; trong đó X là W hoặc V, ví dụ, W); và

CDR3 chứa trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F, ví dụ, W);

và

(2) chất gắn kết LAG3 bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chất gắn kết LAG3 bất kỳ nêu trong bảng B-1 hoặc B-2, tùy ý, mỗi chất gắn kết độc lập bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 sự thay thế axit amin (ví dụ, đột biến bảo toàn) hoặc :

CDR1 chứa trình tự axit amin GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65);

CDR2 chứa trình tự axit amin AISESGGRTH (SEQ ID NO: 66); và

CDR3 chứa trình tự axit amin TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67),

và, tùy ý, chất kéo dài thời gian bán thải và/hoặc chất kéo dài đầu tận cùng C, ví dụ, chất gắn kết HSA như nêu ở đây và/hoặc, tùy ý chất kéo dài đầu tận cùng C như Alanin.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 như được nêu ở trên trong phần "chất gắn kết PD1", ví dụ, chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, 98, 99, 103, 104 hoặc 105 (tùy ý trong đó gốc 1 là E hoặc D). Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết LAG3 như được nêu ở trên trong phần "chất gắn kết LAG3", ví dụ, chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, 64 hoặc 95 (tùy ý trong đó gốc 1 là E hoặc D).

Chất gắn kết đa đặc hiệu có thể bao gồm PD1 và LAG3 và, tùy ý, chất gắn kết HSA cũng như một hoặc nhiều chất gắn kết mà gắn kết với kháng nguyên bổ sung như, CD27, CTLA4, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2 CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17 hoặc TSLP.

Khi chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) chứa một hoặc nhiều miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết hơn nữa (ví dụ, miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết không có chức năng khác chống lại PD1 và/hoặc LAG3 mà tạo ra tính đặc hiệu tăng chống lại PD1 và/hoặc LAG3, miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết chống lại đích điều trị không phải PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, CTLA4, BTLA hoặc CD27), miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết chống lại đích như albumin huyết thanh người mà tạo ra thời gian bán thải tăng, và/hoặc miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết mà tạo đích chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 với tế bào đặc hiệu, mô hoặc cơ quan cụ thể và/hoặc mà đối với chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 được đưa vào tế bào), miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết khác này tốt hơn là chứa một hoặc nhiều ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn), và tốt hơn nữa nếu là tất cả ISVD. Ví dụ và không giới hạn, một hoặc nhiều miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết khác nữa có thể là một hoặc nhiều kháng thể miền đơn (bao gồm VHH, VHH được làm giống người và/hoặc VH được làm giống lạc đà như VH của người được làm giống lạc đà), kháng thể (miền đơn) là miền VH hoặc được lấy từ miền VH, dAb là hoặc về cơ bản bao gồm miền VH hoặc được lấy từ miền VH, hoặc ngay cả kháng thể miền (đơn) hoặc dAb là hoặc về cơ bản bao gồm miền VL. Cụ thể, một hoặc nhiều miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết này, khi có mặt, có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng thể miền

đơn, và cụ thể hơn là tất cả kháng thể miền đơn. Theo một phương án của sáng chế, ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn) mà gắn kết đích không phải PD1 và/hoặc LAG3 gắn kết với đích khác như HSA, CTLA-4, BTLA hoặc CD27.

Khi chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế có ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn) ở đầu tận cùng C (ví dụ, mà ISVD tận cùng C gắn kết với PD1 và/hoặc LAG3 hoặc có thể, ví dụ, là, nếu có mặt trong polypeptit, ISVD không có chức năng khác về cơ bản chống lại PD1 và/hoặc LAG3 mà tạo ra tính đặc hiệu tăng chống lại PD1 và/hoặc LAG3, ISVD chống lại đích điều trị không phải PD1 và/hoặc LAG3, ISVD chống lại đích như albumin huyết thanh người mà tạo ra thời gian bán thải tăng, hoặc ISVD mà tạo đích chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 với tế bào đặc hiệu, mô hoặc cơ quan cụ thể và/hoặc mà đối với chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 được đưa vào tế bào), sau đó, tốt hơn là chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (nghĩa là, bao gồm ISVD tận cùng C) có phần kéo dài đầu tận cùng C X(n) (ví dụ, -Ala), phần kéo dài đầu tận cùng C có thể được mô tả ở đây đối với chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế và/hoặc như được mô tả trong WO 12/175741 hoặc PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Khi chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 bao gồm, ngoài một hoặc nhiều nhóm mà gắn kết với PD1 và/hoặc LAG3, còn ISVD bất kỳ (ví dụ, kháng thể miền đơn) (một hoặc nhiều ISVD nữa có thể, như đã nêu, là ISVD không có chức năng khác về cơ bản chống lại PD1 và/hoặc LAG3 mà tạo ra tính đặc hiệu tăng chống lại PD1 và/hoặc LAG3, ISVD chống lại đích điều trị không phải PD1 và/hoặc LAG3, ISVD chống lại đích như albumin huyết thanh người mà tạo ra thời gian bán thải tăng, và/hoặc ISVD mà tạo đích polypeptit theo sáng chế với tế bào đặc hiệu, mô hoặc cơ quan cụ thể và/hoặc mà đối với polypeptit theo sáng chế được đưa vào tế bào), và trong đó ISVD này là kháng thể miền đơn hoặc là ISVD mà là, hoặc về cơ bản bao gồm và/hoặc lấy từ trình tự VH, sau đó theo khía cạnh ưu tiên của sáng chế, một hoặc nhiều (và tốt hơn là tất cả) các ISVD này có mặt trong chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 sẽ chứa một hoặc nhiều đột biến khung trong trình tự của chúng mà làm giảm sự gắn kết bằng các kháng thể đã có trước đó. Cụ thể, theo khía cạnh này của sáng chế, các ISVD này có thể chứa tổ hợp thích hợp của các gốc axit

amin/đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 74, 83, 89, 110 và/hoặc 112 như được mô tả trong PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325) và/hoặc về cơ bản như mô tả ở đây đối với chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế. Theo một khía cạnh cụ thể, khi chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 có ISVD ở đầu tận cùng C, sau đó ISVD này có mặt ở và/hoặc tạo thành tận cùng C có các đột biến khung này mà làm giảm sự gắn kết bằng các kháng thể đã có trước đó; và ISVD tận cùng C này tốt hơn là còn có phần kéo dài đầu tận cùng C X(n) (ví dụ, -Ala) như mô tả ở đây.

Khi chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 có thời gian bán thải tăng (nghĩa là, so với chất gắn kết đơn trị theo sáng chế mà thiếu chất kéo dài thời gian bán thải như ALB11002), tốt hơn là chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 chứa ít nhất một (ví dụ, một) ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn) tạo ra thời gian bán thải tăng (ví dụ, ALB11002). ISVD này, theo một phương án của sáng chế, nhằm chống lại protein huyết thanh thích hợp như transferrin hoặc chống lại albumin huyết thanh (người). Cụ thể, ISVD hoặc kháng thể miền đơn này có thể là kháng thể miền (đơn) hoặc dAb chống lại albumin huyết thanh người như được mô tả trong ví dụ EP 2 139 918, WO 2011/006915, WO 2012/175400, WO 2014/111550 và cụ thể là, có thể là kháng thể miền đơn gắn kết albumin huyết thanh như được mô tả trong WO 2004/041865, WO 2006/122787, WO 2012/175400 hoặc PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325). Các ISVD gắn kết albumin huyết thanh được đặc biệt ưu tiên là kháng thể miền đơn Alb-1 (xem WO 2006/122787) hoặc các biến thể được làm giống người của nó như Alb-8 (WO 2006/122787, SEQ ID NO: 62), Alb-23 (WO 2012/175400, SEQ ID NO: 1) và các biến thể được làm giống người khác (và tốt hơn là còn được tối ưu hóa trình tự) của Alb-1 và/hoặc các biến thể của Alb-8 hoặc Alb-23 (hoặc thông thường hơn là các ISVD về cơ bản giống có cùng các CDR như Alb-1, Alb-8 và Alb-23).

Như được bàn luận, "chất gắn kết HSA" theo sáng chế là phân tử bất kỳ, như các phân tử mô tả ở đây, mà gắn kết với HSA (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) cũng như chất gắn kết đa hóa trị hoặc đa đặc hiệu bao gồm phân tử được dung hợp với chất gắn kết khác. Chất gắn kết HSA riêng rẽ có thể được đề cập đến là nhóm gắn kết HSA

nếu nó là một phần của phân tử lớn hơn, ví dụ, phân tử đa hóa trị, trong đó nhóm gắn kết HSA được dung hợp với nhóm gắn kết khác.

Theo một phương án của sáng chế, chất kéo dài thời gian bán thải là ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn) mà gắn kết với albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002 như được tóm tắt trong Bảng C dưới đây.

Như được mô tả tiếp ở đây, chất gắn kết HSA theo sáng chế tốt hơn là có cùng tổ hợp các CDR (nghĩa là, CDR1, CDR2 và CDR3) có mặt trong ALB11002 hoặc chứa trình tự của ALB11002 (SEQ ID NO: 59). Xem bảng C.

Sáng chế còn bao gồm các chất gắn kết HSA là các biến thể của ALB11002 chứa trình tự axit amin như nêu trong Bảng C dưới đây. Phạm vi theo sáng chế bao gồm chất gắn kết HSA bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của các biến thể nêu dưới đây trong Bảng C.

Ngoài ra, sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1/LAG3 chứa nhóm gắn kết HSA bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 hoặc trình tự axit amin của ALB11002 hoặc của một trong số các biến thể của nó nêu dưới đây trong Bảng C.

Bảng C. Kháng thể albumin huyết thanh người (Human serum albumin - HSA)

ALB11002

SEQ ID NO	**Mô tả**	**Trình tự**
59	ALB11002 (ở đây có thể được gọi là "ALB201")	EVQLVESGGG XVQPGNSLRL SCAAS**GFTFS SFGMS**WVRQA PGKGLEWVS**S ISGSGSDTLY** ADSVKGRFTI SRDNAKTTLY LQMNSLRPED TAXYYCTI**GG SLSR**SSQGTL VTVSSA; trong đó X ở các gốc 11 và 93 là L hoặc V
60	CDR1	GFTFSSFGMS hoặc SFGMS (các axit amin 1-5 của SEQ ID NO: 60)

61	CDR2	SISGSGSDTLYADSVKG hoặc SISGSGSDTL (các axit amin 1-10 của SEQ ID NO: 61)
62	CDR3	GGSLSR

* Tùy ý, ALB11002 thiếu Alanin đầu tận cùng C. Tùy ý, chất gắn kết HSA chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59 mà bao gồm đột biến E1D, V11L và/hoặc đột biến L93V, ví dụ, chứa trình tự axit amin:
EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 59)

Theo một phương án của sáng chế, axit amin thứ nhất của chất gắn kết HSA theo sáng chế là E. Theo một phương án của sáng chế, axit amin thứ nhất của chất gắn kết HSA theo sáng chế là D.

Sáng chế bao gồm các phương án trong đó mỗi trong số một, hai hoặc ba CDR của chất gắn kết HSA bao gồm 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5 sự thay thế axit amin, ví dụ, thay thế bảo toàn, và/hoặc bao gồm 99, 98, 97, 96 hoặc 95% độ đồng nhất trình tự so với trình tự CDR nêu trong bảng C, trong đó chất gắn kết HSA có CDR giữ khả năng gắn kết với HSA.

Theo một phương án của sáng chế, chất kéo dài thời gian bán thải là ISVD HSA (ví dụ, kháng thể miền đơn) bao gồm:

- CDR1 chứa trình tự axit amin GFTFSSFGMS (SEQ ID NO: 60); và
- CDR2 chứa trình tự axit amin SISGSGSDTL (SEQ ID NO: 61); và
- CDR3 chứa trình tự axit amin GGSLSR (SEQ ID NO: 62);

và, tùy ý, có:

- độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (trong đó phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt cũng như CDR không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự) là ít nhất bằng 85%, tốt hơn là ít nhất bằng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 95% (trong đó CDR, phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt không được tính đến để xác định độ đồng nhất trình tự);

và/hoặc

- không nhiều hơn 7, như không nhiều hơn 5, tốt hơn là không nhiều hơn 3, như chỉ 3, 2 hoặc 1 "sự khác biệt axit amin" (không tính đến phần kéo dài đầu tận cùng C bất kỳ có thể có mặt) với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (trong đó sự khác biệt axit amin này, nếu có, có thể có mặt trong khung và/hoặc CDR nhưng tốt hơn là chỉ có mặt trong khung và không có mặt trong CDR);

và tùy ý có:

- phần kéo dài đầu tận cùng C $(X)_n$, trong đó n là 1 đến 10, tốt hơn là 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4 hoặc 5 (và tốt hơn là 1 hoặc 2, như 1); và mỗi X là gốc axit amin (tốt hơn là có trong tự nhiên) mà độc lập được chọn, và tốt hơn là độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), glyxin (G), valin (V), leuxin (L) hoặc isoleuxin (I).

ISVD gắn kết albumin huyết thanh người này (ví dụ, kháng thể miền đơn), khi có mặt, có thể chứa một hoặc nhiều đột biến khung trong trình tự của nó mà làm giảm sự gắn kết bằng các kháng thể đã có trước đó. Cụ thể, khi ISVD gắn kết albumin huyết thanh là kháng thể miền đơn hoặc kháng thể miền (đơn) là, về cơ bản bao gồm và/hoặc được lấy từ miền VH, ISVD gắn kết albumin huyết thanh có thể chứa (tổ hợp thích hợp của) các gốc axit amin/đột biến ở các vị trí 11, 89, 110 và/hoặc 112 như được mô tả trong PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325) và/hoặc về cơ bản như mô tả ở đây đối với chất gắn kết PD1 theo sáng chế. Ví dụ, PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325) mô tả một số biến thể của Alb-1, Alb-8 và Alb-23 mà chứa các gốc axit amin/đột biến ở các vị trí 11, 89, 110 và/hoặc 112 mà làm giảm sự gắn kết bằng các kháng thể đã có trước đó mà có thể được sử dụng trong polypeptit theo sáng chế.

Khi ISVD gắn kết albumin huyết thanh (ví dụ, kháng thể miền đơn) có mặt ở đầu tận cùng C của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3, ISVD gắn kết albumin huyết thanh (và kết quả là, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế) tốt hơn là có phần kéo dài đầu tận cùng C X(n), phần kéo dài đầu tận cùng C có thể được mô tả ở đây đối với chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế và/hoặc như được mô tả trong WO 12/175741 hoặc PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325). Ví dụ, phần kéo dài đầu tận cùng C có thể là gốc Alanin đơn. Tốt hơn nếu nó có các đột biến làm giảm sự gắn kết của các kháng

thể đã có trước đó, như (tổ hợp thích hợp của) các gốc axit amin/đột biến ở các vị trí 11, 89, 110 và/hoặc 112 được mô tả trong PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Tuy nhiên, như đã nêu, ý nghĩa khác của việc tăng thời gian bán thải của polypeptit theo sáng chế (như PEGyl hóa, dung hợp với albumin của người hoặc mảnh thích hợp của nó, hoặc việc sử dụng peptit gắn kết albumin huyết thanh thích hợp), cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Nói chung, khi chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế có thời gian bán thải tăng (ví dụ, nhờ sự có mặt của ISVD làm tăng thời gian bán thải (ví dụ, kháng thể miền đơn) hoặc cách thích hợp bất kỳ khác làm tăng thời gian bán thải), chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 thu được theo sáng chế tốt hơn là có thời gian bán thải (như được xác định ở đây) nhiều hơn ít nhất là 2 lần, tốt hơn là ít nhất bằng 5 lần, ví dụ ít nhất 10 lần hoặc nhiều hơn 20 lần, nhiều hơn thời gian bán thải của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế thiếu chất kéo dài thời gian bán thải (đo được ở người và/hoặc ở mẫu động vật thích hợp, như chuột nhắt hoặc khỉ cynomolgus). Cụ thể, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế tốt hơn là có thời gian bán thải (như được xác định ở đây) ở đối tượng người ít nhất là 1 ngày, tốt hơn là ít nhất bằng 3 ngày, tốt hơn nữa là ít nhất bằng 7 ngày, như ít nhất 10 ngày.

Sẽ là rõ ràng nhờ vào phần mô tả ở đây, chất gắn kết PD1 và chất gắn kết LAG3 dựa vào một hoặc nhiều ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn) có thể có "các dạng" khác nhau, nghĩa là về cơ bản là đơn trị, hóa trị hai hoặc hóa trị ba, có thể là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép, đặc hiệu ba v.v., và có thể là có hai vị trí nhận diện kháng nguyên (như được xác định ở đây và trong ví dụ WO2009/68625). Ví dụ, chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế có thể là:

- đơn trị, nghĩa là chứa nhóm gắn kết PD1 hoặc LAG3 đơn (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn). Như đã nêu, khi sử dụng ở dạng đơn trị, chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế tốt hơn là có phần kéo dài đầu tận cùng C X(n) như được mô tả tiếp ở đây. Chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 này theo sáng chế có thể còn được kéo dài thời gian bán thải;

- có thể là hóa trị hai hoặc hóa trị ba và đặc hiệu đơn. Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 này theo sáng chế bao gồm hai hoặc nhiều ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn) chống lại PD1 hoặc chống lại LAG3, tương ứng, có thể là giống hoặc khác nhau; và nếu khác nhau, có thể nhằm chống lại epitop giống nhau của PD1 hoặc LAG3, hoặc chống lại epitop khác nhau trên PD1 hoặc LAG3 (trong trường hợp khác nhau, để tạo ra chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 có hai vị trí nhận diện kháng nguyên hoặc nhiều hai vị trí nhận diện kháng nguyên theo sáng chế). Chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế này có thể còn có thời gian bán thải kéo dài;
- có thể là hóa trị hai, hóa trị ba (hoặc đa trị) và đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu ba (hoặc đa đặc hiệu). Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 theo sáng chế nhằm chống lại PD1 và ít nhất một đích khác như, ví dụ, CTLA-4, LAG-3, BTLA và/hoặc CD27; ví dụ, bao gồm nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết CTLA4; nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết BTLA; nhóm gắn kết PD1 và nhóm gắn kết LAG3 (nghĩa là, chất gắn kết PD1/LAG3); hoặc nhóm gắn kết PD1, nhóm gắn kết LAG3 và nhóm gắn kết BTLA. như mô tả ở đây, đích khác này có thể, ví dụ, là đích khác thích hợp về mặt điều trị (nghĩa là, không phải PD1) sao cho tạo ra chất gắn kết PD1 theo sáng chế là đặc hiệu kép đối với PD1 và đích điều trị khác này. Đích điều trị khác này cũng có thể là đích mà tạo ra thời gian bán thải tăng (như albumin huyết thanh người), sao cho tạo ra chất gắn kết PD1 theo sáng chế mà làm tăng thời gian bán thải. Cũng được nêu ở đây, đích khác này còn cho phép, đối với chất gắn kết PD1 theo sáng chế, tạo đích với các tế bào đặc hiệu, mô hoặc cơ quan cụ thể hoặc có thể cho phép, đối với chất gắn kết PD1 theo sáng chế, đưa vào tế bào. Cũng có thể kết hợp các cách tiếp cận này/ISVD, ví dụ tạo ra chất gắn kết PD1 theo sáng chế là đặc hiệu kép đối với PD1 và đối với ít nhất một đích khác thích hợp về mặt điều trị và thời gian bán thải được kéo dài.

Mặt khác, tốt hơn là, khi chất gắn kết PD1 và chất gắn kết LAG3 này bao gồm một hoặc nhiều ISVD (ví dụ, kháng thể miền đơn) không phải nhóm gắn kết PD1 hoặc nhóm gắn kết LAG3, ít nhất một và tốt hơn là tất cả các ISVD khác này sẽ chứa một hoặc nhiều

đột biến khung trình tự của nó mà làm giảm sự gắn kết bằng các kháng thể đã có trước đó (như, cụ thể, tổ hợp các gốc axit amin/đột biến ở các vị trí 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 và/hoặc 112 là như mô tả ở đây đối với chất gắn kết PD1 và chất gắn kết LAG3 theo sáng chế và/hoặc thường được mô tả trong PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325)). Hơn nữa, khi chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế có nhóm gắn kết PD1 hoặc nhóm gắn kết LAG3, tương ứng, ở đầu tận cùng C, thì nhóm gắn kết PD1 hoặc nhóm gắn kết LAG3 tận cùng C (và kết quả là, chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế) tốt hơn là có phần kéo dài đầu tận cùng C X(n) như mô tả ở đây. Tương tự, khi chất gắn kết PD1 chất gắn kết LAG3 theo sáng chế có ISVD khác ở đầu tận cùng C của chúng (nghĩa là, không phải nhóm gắn kết PD1 hoặc nhóm gắn kết LAG3, nhưng, ví dụ, ISVD kéo dài thời gian bán thải), thì ISVD đầu tận cùng C (và, kết quả là, chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế tốt hơn là có phần kéo dài đầu tận cùng C X(n) như mô tả ở đây và/hoặc sẽ chứa một hoặc nhiều đột biến khung trình tự của nó mà làm giảm sự gắn kết bằng các kháng thể đã có trước đó (hơn nữa, như được mô tả tiếp ở đây và trong PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325)).

Sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, khi chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế được dự tính để dùng tại chỗ (nghĩa là, trên da hoặc trong mắt) hoặc, ví dụ, nghĩa là có hoạt tính điều trị (khoanh vùng) ở đâu đó trong, ví dụ đường GI (nghĩa là, sau khi dùng qua đường miệng hoặc dùng bằng cách đặt hậu môn) hoặc trong phổi (nghĩa là, sau khi dùng bằng cách hít) hoặc mặt khác, có nghĩa là dùng trực tiếp cho nơi dự tính cần tác động (ví dụ, bằng cách tiêm trực tiếp), chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế thường sẽ không cần kéo dài thời gian bán thải. Hơn nữa, để điều trị một số tình trạng bệnh hoặc dấu hiệu cấp tính nhất định, tốt hơn là có thể không cần có thời gian bán thải kéo dài. Trong trường hợp này, ưu tiên sử dụng chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 đơn trị theo sáng chế hoặc sử dụng chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 khác theo sáng chế (bao gồm chất gắn kết PD1 hoặc chất LAG3) mà không kéo

dài thời gian bán thải, ví dụ, chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế là hóa trị hai hoặc có hai vị trí nhận diện kháng nguyên đối với PD1 hoặc LAG3.

Một số ví dụ được ưu tiên, nhưng không giới hạn về chất gắn kết PD1 và hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế được thể hiện dưới dạng giản đồ trong Bảng D-1a và D-1b dưới đây, và mỗi trong số đó tạo thành một khía cạnh khác của sáng chế. Ví dụ khác về polypeptit thích hợp theo sáng chế mà không kéo dài thời gian bán thải sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào phần mô tả ở đây.

Bảng D-1a: Trình bày dưới dạng giản đồ một số chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế mà không có ISVD kéo dài thời gian bán thải.

[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]- [chất khác]-[chất khác]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]- [chất khác]-[chất khác]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]- [chất khác]-[chất khác]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]- [chất khác]-[chất khác]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-X(n)
[chất khác]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[chất khác]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)

[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]- [Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]- [Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-X(n)
[chất khác]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[chất khác]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
Chú thích: - "*[Chất gắn kết PD1 theo sáng chế]*" là miền gắn kết hoặc nhóm hoặc đơn vị gắn kết PD1 như ISVD 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) như mô tả ở đây - "-" là liên kết cộng hoá trị trực tiếp hoặc thành phần liên kết thích hợp, như thành phần liên kết 9GS, 15GS hoặc 35GS

- "*X(n)*" là phần kéo dài đầu tận cùng C như được xác định ở đây như gốc alanin đơn. - *"[chất khác]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) chống lại epitop mà khác với chất gắn kết PD1, ví dụ, một hoặc nhiều CTLA4, BTLA, LAG3 và/hoặc CD27 ISVD như LAG3 ISVD 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) như mô tả ở đây - *"[Thành phần hướng đích]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết (và cụ thể là ISVD như kháng thể miền đơn) mà tạo đích polypeptit theo sáng chế đến tế bào, mô hoặc cơ quan đặc hiệu

Bảng D-1b: Trình bày dưới dạng giản đồ một số chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế mà không có ISVD kéo dài thời gian bán thải.

[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]- [chất khác]-[chất khác]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]- [chất khác]-[chất khác]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]- [chất khác]-[chất khác]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]- [chất khác]-[chất khác]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-X(n)
[chất khác]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất khác]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]

[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]- [chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]- [chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-X(n)
[chất khác]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất khác]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
Chú thích: - "*[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]*" là miền gắn kết hoặc nhóm hoặc đơn vị gắn kết LAG3 như ISVD 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) như mô tả ở đây

- "-" là liên kết cộng hoá trị trực tiếp hoặc thành phần liên kết thích hợp, như thành phần liên kết 9GS, 15GS hoặc 35GS
- "*X(n)*" là phần kéo dài đầu tận cùng C như được xác định ở đây như gốc alanin đơn.
- *"[chất khác]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) chống lại epitop mà khác với chất gắn kết PD1, ví dụ, một hoặc nhiều CTLA4, BTLA, LAG3 và/hoặc CD27 ISVD như PD1 ISVD 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) như mô tả ở đây
- *"[Thành phần hướng đích]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết (và cụ thể là ISVD như kháng thể miền đơn) mà tạo đích polypeptit theo sáng chế với tế bào, mô hoặc cơ quan đặc hiệu

Sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, khi chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 (ví dụ, bao gồm ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế được dự tính để dùng toàn thân và/hoặc để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn mạn tính, thường được ưu tiên là chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 này theo sáng chế có thời gian bán thải tăng (như được xác định ở đây). Tốt hơn nữa là, chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 theo sáng chế sẽ chứa ISVD kéo dài thời gian bán thải (ví dụ, kháng thể miền đơn) như, tốt hơn là, ISVD và cụ thể là kháng thể miền đơn gắn kết với albumin huyết thanh người (như được mô tả ở đây).

Một số ví dụ được ưu tiên, nhưng không giới hạn về chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 này theo sáng chế được thể hiện dưới dạng giản đồ trong Bảng D-2a và D-2b dưới đây, và mỗi trong số đó tạo thành một khía cạnh khác của sáng chế. Ví dụ khác về chất gắn kết PD1 hoặc chất gắn kết LAG3 thích hợp theo sáng chế có kéo dài thời gian bán thải sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào phần mô tả ở đây. Nói chung, đối với polypeptit theo sáng chế có kéo dài thời gian bán thải, sự có mặt của phần kéo dài đầu tận cùng C được ưu tiên hơn.

Bảng D-2a: Trình bày dưới dạng giản đồ một số chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế có ISVD kéo dài thời gian bán thải.

[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-[HLE]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]- [Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-[chất khác]-[HLE]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-[HLE] -X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]- [Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-[chất khác]-[HLE] -X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[chất khác]
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]
[HLE] -[chất khác]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[chất khác]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]
[chất khác] -[HLE] -[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-[HLE]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[chất khác]-X(n)
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-X(n)
[HLE] -[chất khác]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[chất khác]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)

[chất khác] -[HLE] -[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-[HLE]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Thành phần hướng đích]
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]
[Thành phần hướng đích]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[HLE]-[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-[HLE]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[HLE]-[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-[HLE]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Thành phần hướng đích]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-[HLE]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)

[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Thành phần hướng đích]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[HLE]-[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[HLE]-[Thành phần hướng đích]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)
[HLE]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-X(n)

[Chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[chất khác]-[HLE]
Chú thích: - *"[Chất gắn kết PD1 theo sáng chế]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết PD1 như PD1 ISVD 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) như mô tả ở đây - "-" là liên kết cộng hoá trị trực tiếp hoặc thành phần liên kết thích hợp, như thành phần liên kết 9GS, 15GS hoặc 35GS - *"X(n)"* là phần kéo dài đầu tận cùng C như được xác định ở đây như gốc alanin đơn. - *"[HLE]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết kéo dài thời gian bán thải (và cụ thể là ISVD kéo dài thời gian bán thải, như kháng thể miền đơn), như ISVD (và cụ thể là kháng thể miền đơn) chống lại albumin huyết thanh (người) như ISVD kháng HSA ALB11002 như mô tả ở đây; - *"[chất khác]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) chống lại epitop mà khác với chất gắn kết PD1, ví dụ, một hoặc nhiều CTLA4, BTLA, LAG3 và/hoặc CD27 ISVD, như LAG3 ISVD 11B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L) như mô tả ở đây - *"[Thành phần hướng đích]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết (và cụ thể là ISVD như kháng thể miền đơn) mà tạo đích polypeptit theo sáng chế với tế bào, mô hoặc cơ quan đặc hiệu

Bảng D-2b: Trình bày dưới dạng giản đồ một số chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế có ISVD kéo dài thời gian bán thải.

[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]

[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-[HLE]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]- [chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-[chất khác]-[HLE]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-[HLE] -X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]- [chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-[chất khác]-[HLE] -X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất khác]
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]
[HLE] -[chất khác]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất khác]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]
[chất khác] -[HLE] -[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-[HLE]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất khác]-X(n)
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-X(n)
[HLE] -[chất khác]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất khác]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[chất khác] -[HLE] -[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-[HLE]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[Thành phần hướng đích]
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]
[Thành phần hướng đích]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[HLE]-[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-[HLE]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[Thành phần hướng đích]-X(n)

[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[HLE]-[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-[HLE]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[Thành phần hướng đích]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết PD-1 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-[HLE]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[Thành phần hướng đích]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[Thành phần hướng đích]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[HLE]-[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]

[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[Thành phần hướng đích]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[HLE]-[Thành phần hướng đích]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[HLE]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-X(n)
[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]-[chất khác]-[HLE]
Chú thích: - "*[chất gắn kết LAG3 theo sáng chế]*" là miền gắn kết hoặc nhóm hoặc đơn vị gắn kết LAG3 như ISVD LAG3 ISVD 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) như mô tả ở đây - "-" là liên kết cộng hoá trị trực tiếp hoặc thành phần liên kết thích hợp, như thành phần liên kết 9GS, 15GS hoặc 35GS - "*X(n)*" là phần kéo dài đầu tận cùng C như được xác định ở đây như gốc alanin đơn.

- *"[HLE]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết kéo dài thời gian bán thải (và cụ thể là ISVD kéo dài thời gian bán thải, như kháng thể miền đơn), như ISVD (và cụ thể là kháng thể miền đơn) chống lại albumin huyết thanh (người) như ISVD kháng HSA ALB11002 như mô tả ở đây;
- *"[chất khác]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) chống lại epitop mà khác với chất gắn kết PD1, ví dụ, một hoặc nhiều CTLA4, BTLA, LAG3 và/hoặc CD27 ISVD, như PD1 ISVD 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) như mô tả ở đây
- *"[Thành phần hướng đích]"* là miền gắn kết hoặc đơn vị gắn kết (và cụ thể là ISVD như kháng thể miền đơn) mà tạo đích polypeptit theo sáng chế với tế bào, mô hoặc cơ quan đặc hiệu

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1/LAG3 theo sáng chế được tóm tắt dưới đây trong Bảng D-3

Bảng D-3. Chất gắn kết PD1/LAG3 theo sáng chế.

Mô tả	Trình tự
Tên: F023700899 Mô tả: 1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-35GS-1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-35GS-F0237611B09-35GS-F0237611B09-35GS-ALB11002 Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITYY** ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT AIYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS **GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSG GITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSL RPEDTAIYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAAS**GRTFSDYVMG**WFRQARGNEREFVA**A ISESGGRTH**YADAVKGRFTISRDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVYYCAT**TLLWWTSEYAP IKANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS

	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVM GWFRQARGNEREFVAAISESGGRTHYADA VKG**RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAV YYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSS
Tên: F023700931 Mô tả: 1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-1PD102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 107	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITYY** ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS **GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSG GITYYADSVKG**RFTISRDNSKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**A ISESGGRTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPI KANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG** WFRQAPGKEREFVA**AISESGGRTHYADSVK** GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYC AT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS

	GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS A
Tên: F023701016 Mô tả: 102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R, I89L)-20GS- 102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) -20GS- F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43 K,A62S,A74S,K83R,V89L)-20GS- F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43 K,A62S,A74S,K83R,V89L)-20GS- ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 108	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITYY** ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQA PGKEREFVA**VITWSGGITY**YADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DK HQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA **AISESGGRTH**YADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPI KANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**A ISESGGRTH**YADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPI KANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS A
Tên: F023701017 Mô tả: 102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R, I89L)-9GS- 102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) -9GS-	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITYY** ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VIT WSGGITY**YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ

F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-9GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-9GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 109	MNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESGGRTH**YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023700924 Mô tả: 1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS- F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 110	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITYY**ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESGGRTH**YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023700969	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITYY**ADSVKGRFTISRDNSKN

Mô tả: 102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R, I89L)-20GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-20GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 111	TVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESGGRTHYAD**SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023700970 Mô tả: 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-9GS-F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S, K83R,V89L)-9GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 112	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITWSGGITYY**ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSWYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESGGRTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701163 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-1PD102C12	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY**ADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS

(L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 113	GSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSG GITYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAA ISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPI KANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMG WFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYC ATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS A
Tên: F023701168 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASI HAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYY ADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVIT VSGGITYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGK EREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWW TSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASG

SEQ ID NO: 114	**RTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESGG RTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDY DY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFT ISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701173 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 115	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS **GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESG GRTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNS LRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKAND YDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701178 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AIS ESGGRTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIK ANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV

SEQ ID NO: 116	KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYY CTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701161 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 117	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS **GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSG GITYY**ADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**A ISESGGRTHY**ADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPI KANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG** WFRQAPGKEREFVA**AISESGGRTHY**ADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYC AT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS A
Tên: F023701166 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-1PD102C12	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VIT**

(L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 118	**VSGGITY**YADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQ PGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPG KEREFVA**AISESGGRTH**YADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLW WTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAA S**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISES GGRTH**YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKAND YDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701171 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 119	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS **GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESG GRTH**YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKAND YDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701176 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R,	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDT

I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 120	ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AIS** **ESGGRTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIK** **ANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYY CTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701162 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 121	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI** **HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS **GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSG** **GITYYADSVKG**RFTISRDSSKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**A** **ISESGGRTHYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPI** **KANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG** WFRQAPGKEREFVA**AISESGGRTHYADSVK** GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYC AT**TLLWWTSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM

	NSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS A
Tên: F023701167 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 122	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AAS**GSIASIHAMG**WFRQAPGKEREFVA**VIT VSGGITYY**ADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQG TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGK EREFVA**AISESGGRTHY**ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT**TLLWW TSEYAPIKANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGS GGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASG **RTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESGG RTHY**ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKANDY DY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFT ISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGG SLSRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701172 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS **GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AISESG GRTHY**ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIKAND YDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 123	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTLVTVSSA
Tên: F023701177 Mô tả: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Đích: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 124	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS**GSIASI HAMG**WFRQAPGKEREFVA**VITVSGGITYY** ADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDT ALYYCAG**DKHQSSFYDY**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AAS**GRTFSDYVMG**WFRQAPGKEREFVA**AIS ESGGRTHY**ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCAT**TLLWWTSEYAPIK ANDYDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYY CTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

*Các CDR của chất gắn kết PD1 và chất gắn kết LAG3 được gạch chân và/hoặc in đậm Tùy ý, gốc thứ nhất của nhóm chất gắn kết bất kỳ trong phân tử được thế bằng D hoặc E nếu thích hợp.

Sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1/LAG3 bất kỳ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 106-124 hoặc trình tự axit amin chứa 80% hoặc nhiều hơn (ví dụ, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%) độ đồng nhất trình tự axit amin (nghĩa là, so sánh các trình tự axit amin đầy đủ) trong đó chất gắn kết PD1/LAG3 giữ lại khả năng gắn kết với PD1 và LAG3 và, tùy ý, HSA.

Sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1/LAG3 bất kỳ có sự sắp xếp các gốc sau:

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (A14P,A74S,K83R)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (A14P,A74S,K83R)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09-

- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 20GS-
- Chất gắn kết PD1 102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 20GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 20GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 20GS-

- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ,ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết PD1 102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 20GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-

- Liên kết peptit, ví dụ, 20GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-

- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-

- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 35GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C

hoặc

- Chất gắn kết PD1 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết LAG3 F023700842-
- Liên kết peptit, ví dụ, 9GS-
- Chất gắn kết albumin huyết thanh người, ví dụ, ALB11002-
- Tuỳ ý alanin kéo dài đầu tận cùng C.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1/LAG3 theo sáng chế bao gồm sự sắp xếp các gốc sau:

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 98;

- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 98;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 63;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 63;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 99;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 20GS SEQ ID NO: 100;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 99;
- thành phần liên kết 20GS SEQ ID NO: 100;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 20GS SEQ ID NO: 100;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;

- thành phần liên kết 20GS SEQ ID NO: 100;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 99;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 20GS SEQ ID NO: 100;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 20GS SEQ ID NO: 100;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 105;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 105 (D1E);
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 105;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 105 (D1E);
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 105;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;

- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 105;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 104;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 104 (D1E);
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 104;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 104 (D1E);
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;

- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 104;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 104;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 103 (N73S);
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO:103 (D1E, N73S);
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 103 (N73S);
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO:103 (D1E, N73S);

- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 103 (N73S);
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS SEQ ID NO: 58;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

hoặc

- Chất gắn kết PD1 SEQ ID NO: 103 (N73S);
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Chất gắn kết LAG3 SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS SEQ ID NO: 125;
- Thành phần liên kết HSA SEQ ID NO: 59;
- Alanin

Kháng thể phong bế chéo

Sáng chế còn đề xuất chất gắn kết phong bế chéo mà có khả năng gắn kết phong bế chéo chất gắn kết bất kỳ bộc lộ ở đây (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177). Chất gắn kết phong bế chéo này có thể là phân tử bất kỳ bộc lộ sự phong bế chéo, ví dụ, ISVD, kháng thể miền đơn, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Nói chung, chất gắn kết (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) hoặc kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà "phong bế chéo" chất gắn kết đối chứng hoặc "cạnh tranh chéo với" chất gắn kết đối chứng là nói đến chất gắn kết (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) hoặc kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà phong bế sự gắn kết chất gắn kết đối chứng với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh bằng 50% hoặc nhiều hơn, và ngược lại, chất gắn kết đối chứng phong bế sự gắn kết của chất gắn kết (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) hoặc kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh bằng 50% hoặc nhiều hơn. Phong bế chéo hoặc cạnh tranh chéo có thể được xác định bằng thử nghiệm bất kỳ đã biết trong tình trạng kỹ thuật, bao gồm cộng hưởng plasmon bề mặt (suface plasmon resonance - SPR), ELISA và phân tích tế bào theo dòng chảy.

Theo một phương án của sáng chế, phong bế chéo được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Biacore. Để tạo thuận lợi cho việc tham chiếu đến hai chất gắn kết, phạm vi theo sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, mảnh Fab, mà phong bế chéo chất gắn kết theo sáng chế. Máy Biacore (ví dụ, Biacore 3000) được hoạt động theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Do đó, trong một thử nghiệm phong bế chéo, PD1 hoặc LAG3 được ghép với chip CM5 Biacore sử dụng phương pháp hóa học ghép amin tiêu chuẩn để tạo ra bề mặt phủ PD1 hoặc LAG3. Ví dụ, 200-800 đơn vị cộng hưởng của PD1 hoặc LAG3 được ghép với chip (hoặc lượng bất kỳ mà tạo ra các mức gắn kết dễ dàng đo được nhưng có thể đã bão hòa bởi nồng độ chất phản ứng thử nghiệm sử dụng).

Hai chất gắn kết (gọi là A* và B*) được đánh giá về khả năng phong bế chéo lẫn nhau được trộn lẫn ở tỷ lệ một với một mol vị trí gắn kết trong chất đệm thích hợp để tạo ra hỗn hợp thử nghiệm.

Nồng độ mỗi chất gắn kết trong hỗn hợp thử nghiệm đủ cao để dễ dàng bão hòa các vị trí gắn kết để chất gắn kết trên phân tử PD1 hoặc LAG3 bị giữ trên chip Biacore. Chất gắn kết trong hỗn hợp ở cùng nồng độ mol.

Các dung dịch riêng rẽ chứa riêng chất gắn kết A* và riêng chất gắn kết B* cũng được chuẩn bị. Chất gắn kết A* và chất gắn kết B* trong các dung dịch này là trong cùng chất đệm và ở cùng nồng độ như trong hỗn hợp thử nghiệm.

Hỗn hợp thử nghiệm được đi qua chip Biacore phủ PD1 hoặc LAG3 và tổng lượng gắn kết được ghi lại. Sau đó, chip được xử lý theo cách loại bỏ các chất gắn kết liên kết mà không gây hại PD1 hoặc LAG3 liên kết chip. Theo một phương án của sáng chế, hỗn hợp được thực hiện bằng cách xử lý chip bằng HCl 30 mM trong 60 giây.

Dung dịch chứa chất gắn kết A* riêng sau đó được đưa qua bề mặt phủ PD1 hoặc LAG3 và lượng gắn kết được ghi lại. Chip lại được xử lý để loại bỏ tất cả chất gắn kết liên kết mà không gây hại PD1 hoặc LAG3 liên kết chip.

Dung dịch chứa chất gắn kết B* riêng sau đó được đưa qua bề mặt phủ PD1 hoặc LAG3 và lượng gắn kết được ghi lại.

Sự gắn kết tối đa theo lý thuyết của hỗn hợp chứa chất gắn kết A* và chất gắn kết B* được tính toán tiếp, và là tổng của sự gắn kết của mỗi chất gắn kết khi đưa qua riêng bề mặt PD1 hoặc LAG3. Nếu sự gắn kết ghi lại thực tế của hỗn hợp nhỏ hơn sự gắn kết tối đa theo lý thuyết, thì hai chất gắn kết là phong bế chéo lẫn nhau.

Do đó, nói chung, chất gắn kết phong bế chéo theo sáng chế là chất gắn kết mà sẽ gắn kết với PD1 hoặc LAG3 trong thử nghiệm phong bế chéo Biacore nêu trên sao cho, trong suốt thử nghiệm và trong sự có mặt của chất gắn kết thứ hai, sự gắn kết ghi lại nằm giữa, ví dụ, 80% và 0,1% (ví dụ, 80% đến 4%) của sự gắn kết tối đa theo lý thuyết, ví dụ, giữa 75% và 0,1% (ví dụ, 75% đến 4%) của sự gắn kết tối đa theo lý thuyết, ví dụ, giữa 70% và 0,1% (ví dụ, 70% đến 4%) của sự gắn kết tối đa theo lý thuyết (như vừa xác định ở trên) của hai chất gắn kết trong hỗn hợp.

Theo một phương án của sáng chế, thử nghiệm ELISA được sử dụng để xác định xem chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 có phong bế chéo hoặc có khả năng phong bế chéo theo sáng chế hay không.

Nguyên tắc chung của thử nghiệm là có chất gắn kết PD1 hoặc LAG3 phủ lên các lỗ của đĩa ELISA. Lượng dư chất phong bế kháng PD1 hoặc LAG3 thứ hai, phong bế chéo tiềm năng được thêm vào dung dịch (nghĩa là, không liên kết với đĩa ELISA). Sau

đó, lượng giới hạn PD1 hoặc LAG3 được thêm vào các lỗ. Chất gắn kết đã phủ và chất gắn kết trong dung dịch cạnh tranh để gắn kết lượng giới hạn phân tử PD1 hoặc LAG3. Đĩa được rửa để loại bỏ PD1 hoặc LAG3 mà không được liên kết bằng chất liên kết đã phủ và cũng để loại bỏ chất gắn kết thứ hai, pha dung dịch cũng như phức hợp bất kỳ tạo thành giữa chất gắn kết thứ hai, pha dung dịch và PD1 hoặc LAG3. Lượng PD1 hoặc LAG3 gắn kết sau đó được đo bằng cách sử dụng chất phản ứng phát hiện PD1 hoặc LAG3 thích hợp. Chất gắn kết trong dung dịch mà có khả năng phong bế chéo chất gắn kết đã phủ sẽ có thể làm giảm số phân tử PD1 hoặc LAG3 mà chất gắn kết đã phủ có thể gắn kết tương đối với số phân tử PD1 hoặc LAG3 mà chất gắn kết đã phủ có thể gắn kết trong sự vắng mặt chất gắn kết thứ hai, pha dung dịch.

Phương pháp biểu hiện

Sáng chế bao gồm các phương pháp tái tổ hợp để tạo ra các chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) bao gồm các bước (i) đưa polynucleotit mã hóa trình tự axit amin của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3, ví dụ, trong đó polynucleotit là trong vectơ và/hoặc được liên kết điều khiển được với gen khởi đầu; (ii) nuôi cấy tế bào chủ (ví dụ, CHO hoặc *Pichia* hoặc *Pichia pastoris*) trong điều kiện thích hợp để biểu hiện polynucleotit và, (iii) tùy ý, tách chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 ra khỏi tế bào chủ và/hoặc môi trường trong đó tế bào chủ phát triển. Xem, ví dụ, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 hoặc WO 2009/068627.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mà mã hóa các chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) như mô tả ở đây (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167;

F023701172; hoặc F023701177). Polynucleotit có thể, theo một phương án của sáng chế, được liên kết điều khiển được với một hoặc nhiều trình tự điều khiển. Polynucleotit có thể ở dạng plasmit hoặc vectơ. Hơn nữa, nói chung, polynucleotit này như được mô tả trong các đơn sáng chế đã công bố của Ablynx N.V., như ví dụ WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 or WO 2009/068627.

Sáng chế còn đề cập đến vật chủ hoặc tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3, vectơ, và/hoặc polypeptit gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 mô tả ở đây (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177). Hơn nữa, nói chung, tế bào chủ này có thể được mô tả trong các đơn sáng chế đã công bố của Ablynx N.V., như ví dụ WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 hoặc WO 2009/068627. Ví dụ về tế bào chủ cụ thể được bàn luận dưới đây.

Tế bào chủ có nhân điển hình và không có nhân điển hình, bao gồm tế bào của động vật có vú là chủ thể biểu hiện của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) đã biết rõ trong tình trạng kỹ thuật và bao gồm nhiều dòng tế bào bất tử lấy từ Trung tâm lưu giữ giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC). Các tế bào này bao gồm, *không kể những cái khác*, tế bào buồng trứng chuột đồng (chuột túi má) Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO), NSO, tế bào SP2, tế bào HeLa, tế bào thận của chuột đồng sơ sinh (baby hamster kidney - BHK), tế bào thận của khỉ (monkey kidney cells - COS), tế bào caxinom tế bào gan người (ví dụ, Hep G2), tế bào A549, tế bào 3T3, tế bào HEK-293 và một số dòng tế bào khác. Tế bào chủ của động vật có vú bao gồm các tế bào của người, chuột nhắt, chuột cống, chó, khỉ, lợn, dê, bò, ngựa và chuột đồng (chuột túi má). Các dòng tế bào được đặc biệt ưu tiên được lựa chọn bằng cách xác định dòng tế bào nào có các mức biểu hiện cao. Các dòng tế bào khác mà có thể được sử dụng là các dòng tế bào của côn trùng (ví dụ, *Spodoptera frugiperda* hoặc *Trichoplusia ni*), tế bào lưỡng cư, tế bào vi khuẩn, tế bào thực vật và tế bào nấm. Các tế bào nấm bao gồm tế bào nấm men và nấm sợi bao gồm,

ví dụ, *Pichia pastoris, Pichia finlandica, Pichia trehalophila, Pichia koclamae, Pichia membranaefaciens, Pichia minuta* (*Ogataea minuta, Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae, Pichia thermotolerans, Pichia salictaria, Pichia guercuum, Pichia pijperi, Pichia stiptis, Pichia methanolica, Pichia* sp., *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha, Kluyveromyces sp., Kluyveromyces lactis, Candida albicans, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Trichoderma reesei, Chrysosporium lucknowense, Fusarium* sp., *Fusarium gramineum, Fusarium venenatum, Physcomitrella patens* và *Neurospora crassa. Pichia sp.,* bất kỳ *Saccharomyces sp., Hansenula polymorpha,* any *Kluyveromyces sp., Candida albicans,* bất kỳ *Aspergillus sp., Trichoderma reesei, Chrysosporium lucknowense,* bất kỳ *Fusarium sp., Yarrowia lipolytica, và Neurospora crassa.* Sáng chế bao gồm tế bào chủ bất kỳ (ví dụ, tế bào CHO hoặc tế bào *Pichia*, ví dụ, *Pichia pastoris*) chứa chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) hoặc chứa polynucleotit mã hóa chất gắn kết này hoặc chứa vectơ chứa polynucleotit.

Hơn nữa, sự biểu hiện của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) từ dòng tế bào sản xuất có thể được tăng cường sử dụng một số kỹ thuật đã biết. Ví dụ, hệ biểu hiện gen glutamin synthetaza (hệ GS) là phương pháp chung để tăng cường biểu hiện trong một số điều kiện nhất định. Hệ GS được bàn luận trong toàn bộ hoặc một phần của các Patent châu Âu số 0 216 846, 0 256 055, và 0 323 997 và đơn châu Âu số 89303964.4. Do đó, theo một phương án của sáng chế, tế bào chủ của động vật có vú (ví dụ, CHO) thiếu gen glutamin synthetaza và được phát triển trong sự vắng mặt glutamin trong môi trường trong đó, tuy nhiên, polynucleotit mã hóa chuỗi globulin miễn dịch bao gồm gen glutamin synthetaza bổ sung vào sự thiếu hụt gen trong tế bào chủ. Tế bào chủ này chứa chất gắn kết hoặc polynucleotit hoặc vectơ như được bàn luận ở đây cũng như các phương pháp biểu hiện, như được bàn luận ở đây, để tạo ra chất gắn kết sử dụng tế bào chủ là một phần của sáng chế.

Sáng chế bao gồm phương pháp tinh chế chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) bao gồm bước đưa mẫu (ví dụ, môi trường nuôi cấy, dịch dung giải tế bào (dịch ly giải tế bào) hoặc phân đoạn dịch dung giải tế bào, ví dụ, phân đoạn hòa tan của dịch dung giải) chứa chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 vào môi trường tinh chế (ví dụ, môi trường trao đổi cation, môi trường trao đổi anion và/hoặc môi trường trao đổi kỵ nước) và thu chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 đã tinh chế từ phân đoạn chảy hoàn toàn của mẫu này mà không gắn kết với môi trường; hoặc, loại bỏ phân đoạn chảy hoàn toàn và rửa giải chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 liên kết ra khỏi môi trường và thu gom dịch rửa giải. Theo một phương án của sáng chế, môi trường là trong cột mà mẫu được đưa vào. Theo một phương án của sáng chế, phương pháp tinh chế được thực hiện tiếp theo biểu hiện tái tổ hợp của kháng thể hoặc mảnh kháng thể trong tế bào chủ, ví dụ, trong đó tế bào chủ được dung giải đầu tiên và, tùy ý, dịch dung giải được tinh chế chất không tan trước khi tinh chế trong môi trường; hoặc trong đó chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 được tiết vào môi trường nuôi cấy bởi tế bào chủ và môi trường hoặc phân đoạn của nó được đưa vào môi trường tinh chế.

Nói chung, glycoprotein được sản sinh trong dòng tế bào hoặc động vật chuyển gen cụ thể sẽ có mẫu glycosyl hóa là đặc trưng cho glycoprotein sản sinh trong dòng tế bào hoặc động vật chuyển gen. Do đó, mẫu glycosyl hóa cụ thể của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) sẽ phụ thuộc vào dòng tế bào hoặc động vật chuyển gen cụ thể sử dụng để tạo ra chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3. Chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 chỉ chứa *N*-glycan không fucosyl hóa là một phần của sáng chế và có thể là thuận lợi, bởi vì các kháng thể không

fucosyl hóa thường thể hiện hiệu lực hiệu nghiệm hơn các bản sao fucosyl hóa của chúng cả *in vitro* và *in vivo* (xem, ví dụ, Shinkawa *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 3466-3473 (2003); U.S. Patent Nos. 6,946,292 và 7,214,775). Các chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 này với N-glycan không fucosyl hóa không chắc là có khả năng gây miễn dịch vì cấu trúc hydrat cacbon của chúng là thành phần thông thường của quần thể mà tồn tại trong IgG huyết thanh người.

Sáng chế bao gồm chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) chứa glycan liên kết N thường được thêm vào globulin miễn dịch sản sinh trong tế bào buồng trứng chuột đồng (chuột túi má) Trung Quốc (glycan liên kết N của CHO) hoặc vào tế bào nấm men được thiết kế di truyền (glycan liên kết N của nấm men được thiết kế di truyền), như, ví dụ, *Pichia pastoris*. Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 bao gồm một hoặc nhiều "glycan liên kết N của nấm men được thiết kế di truyền" hoặc "glycan liên kết N của CHO" được nêu trên Fig. 4 (ví dụ, G0 và/hoặc G0-F và/hoặc G1 và/hoặc G1-F và/hoặc và/hoặc G2-F và/hoặc Man5). Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 bao gồm glycan liên kết N của nấm men được thiết kế di truyền, nghĩa là, G0 và/hoặc G1 và/hoặc G2, tùy ý, còn bao gồm Man5. Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 bao gồm glycan liên kết N của CHO, nghĩa là, G0-F, G1-F và G2-F, tùy ý, còn bao gồm G0 và/hoặc G1 và/hoặc G2 và/hoặc Man5. Theo một phương án của sáng chế, khoảng 80% đến khoảng 95% (ví dụ, khoảng 80-90%, khoảng 85%, khoảng 90% hoặc khoảng 95%) tất cả glycan liên kết N trên chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 là glycan liên kết N của nấm men được thiết kế di truyền hoặc glycan liên kết N của CHO. Xem Nett *et al.* Yeast. 28(3): 237-252 (2011); Hamilton *et al.* Science. 313(5792): 1441-1443 (2006); Hamilton *et al.* Curr Opin Biotechnol. 18(5): 387-392 (2007). Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, tế bào nấm men được thiết kế di truyền là GFI5.0 hoặc YGLY8316 hoặc chủng nêu trong Patent Mỹ số 7,795,002 hoặc Zha *et al.* Methods Mol Biol. 988:31-43 (2013). Cũng xem công bố đơn quốc tế số WO2013/066765.

Tổ hợp

Theo các phương án cụ thể, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) có thể được dùng riêng, hoặc kết hợp với chất điều trị khác và/hoặc quy trình điều trị khác, để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh bất kỳ như bệnh ung thư, ví dụ, như được bàn luận ở đây, ở đối tượng cần điều trị hoặc ngăn ngừa. Chế phẩm hoặc kit, ví dụ, dược phẩm chứa chất mang dược dụng, bao gồm chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 kết hợp với chất điều trị khác cũng là một phần của sáng chế.

Thuật ngữ "kết hợp với" để chỉ các thành phần, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) cùng với chất khác như pembrolizumab hoặc nivolumab, có thể được bào chế thành chế phẩm đơn, ví dụ, để phân phối đồng thời, hoặc bào chế riêng rẽ thành hai hoặc nhiều chế phẩm (ví dụ, kit). Mỗi thành phần có thể được dùng cho đối tượng ở thời điểm khác với khi dùng thành phần khác; ví dụ, mỗi cách dùng có thể được nêu không đồng thời (ví dụ, riêng rẽ hoặc lần lượt) ở khoảng thời gian trong một giai đoạn cho trước. Hơn nữa, các thành phần riêng rẽ có thể được dùng cho đối tượng theo cách dùng giống hoặc khác nhau (ví dụ, trong đó chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 của sáng chế được dùng ngoài đường tiêu hóa và paclitaxel được dùng qua đường miệng).

Theo các phương án cụ thể, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) có thể được dùng kết hợp với chất điều trị chống ung thư hoặc thuốc điều biến miễn dịch như chất ức chế thụ thể

điều biến miễn dịch, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được kết hợp với một hoặc nhiều chất ức chế (ví dụ, phân tử hữu cơ nhỏ hoặc kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) như: chất ức chế MTOR (mammalian target of rapamycin: đích rapamyxin của động vật có vú), chất gây độc tế bào, chất platin, chất ức chế BRAF, chất ức chế CDK4/6, chất ức chế EGFR, chất ức chế VEGF, chất ổn định vi cấu trúc hình ống, taxan, chất ức chế CD20, chất ức chế CD52, chất ức chế CD30, chất ức chế RANK (Receptor activator of nuclear factor kappa-B: chất hoạt hóa thụ thể yếu tố nhân kappa-B), chất ức chế RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand: chất hoạt hóa thụ thể của phối tử yếu tố nhân kapa-B), chất ức chế ERK, chất ức chế MAP Kinaza, chất ức chế AKT, chất ức chế MEK, chất ức chế PI3K, chất ức chế HER1, chất ức chế HER2, chất ức chế HER3, chất ức chế HER4, chất ức chế Bcl2, chất ức chế CD22, chất ức chế CD79b, chất ức chế ErbB2, hoặc chất ức chế farnesyl protein transferaza.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3(ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được kết hợp với một hoặc nhiều trong số: kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ, pembrolizumab, nivolumab, CT-011), kháng PDL1, kháng CTLA4, kháng TIM3, kháng CS1, (ví dụ, elotuzumab), kháng KIR2DL1/2/3 (ví dụ, lirilumab), kháng CD27, kháng CD137 (ví dụ, urelumab), kháng GITR (ví dụ, TRX518), kháng PD-L1 (ví dụ, BMS-936559, MSB0010718C hoặc MPDL3280A), kháng PD-L2, kháng ILT1, kháng ILT2, kháng ILT3, kháng ILT4, kháng ILT5, kháng ILT6, kháng ILT7, kháng ILT8, kháng

CD40, kháng OX40, kháng CD137, kháng KIR2DL1, kháng KIR2DL2/3, kháng KIR2DL4, kháng KIR2DL5A, kháng KIR2DL5B, kháng KIR3DL1, kháng KIR3DL2, kháng KIR3DL3, kháng NKG2A, kháng NKG2C, kháng NKG2E, hoặc chất ức chế phân tử hữu cơ nhỏ bất kỳ của các đích này; IL-10, kháng IL10, kháng TSLP (thymic stromal lymphopoietin – chất tạo bạch huyết mô đệm tuyến ức) hoặc IL-10 được PEGyl hóa.

Theo một phương án của sáng chế, phân tử lượng của nhóm polyetylen glycol (PEG), trên phân tử IL-10 được PEGyl hóa, là khoảng 12.000 dalton hoặc khoảng 20.000 dalton. Theo một phương án của sáng chế, IL-10 được PEGyl hóa (ví dụ, IL-10 được PEGyl hóa ở người) bao gồm một hoặc nhiều phân tử polyetylen glycol liên kết cộng hóa trị qua thành phần liên kết (ví dụ, C_{2-12} alkyl như --$CH_2CH_2CH_2$--) với gốc axit amin đơn của cấu trúc dưới phân tử đơn IL-10, trong đó gốc axit amin này là nhóm alpha amino của nhóm axit amin đầu tận cùng N hoặc nhóm epsilon amino của gốc lysin. Theo một phương án của sáng chế, IL-10 được PEGyl hóa là: (PEG) $_b$-L-NH-IL-10; trong đó b là 1-9 và L là nhóm liên kết C_{2-12} alkyl liên kết cộng hóa trị với nitơ (N) của gốc axit amin đơn của IL-10. Theo một phương án của sáng chế, IL-10 của IL-10 được PEGyl hóa có công thức: [X--O(CH_2CH_2O)$_n$]$_b$-L-NH-IL-10, trong đó X là H hoặc C_{1-4} alkyl; n là 20 đến 2300; b là 1 đến 9; và L là nhóm liên kết C_{1-11} alkyl được liên kết cộng hóa trị với nitơ (N) của nhóm alpha amino ở đầu tận cùng amino của một cấu trúc dưới phân tử IL-10; với điều kiện khi b lớn hơn 1, thì tổng n không vượt quá 2300. Xem tài liệu US7,052,686.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể kháng IL-10 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ, kháng thể được làm giống người) bao gồm các CDR nêu dưới đây:

CDR-L1: KTSQNIFENLA (SEQ ID NO: 71)

CDR-L2: NASPLQA (SEQ ID NO: 72)

CDR-L3: HQYYSGYT (SEQ ID NO: 73)

CDR-H1: GFTFSDYHMA (SEQ ID NO: 74)

CDR-H2: SITLDATYTYYRDSVRG (SEQ ID NO: 75)

CDR-H3: HRGFSVWLDY (SEQ ID NO: 76)

(xem US7,662,379)

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể kháng TSLP hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ, kháng thể được làm giống người) bao gồm các CDR nêu dưới đây:

CDR-H1: GYIFTDYAMH (SEQ ID NO: 77)

CDR-H2: TFIPLLDTSDYNQNFK (SEQ ID NO: 78)

CDR-H3: MGVTHSYVMDA (SEQ ID NO: 79)

CDR-L1: RASQPISISVH (SEQ ID NO: 80)

CDR-L2: FASQSIS (SEQ ID NO: 81)

CDR-L3: QQTFSLPYT (SEQ ID NO: 82)

(xem WO2008/76321)

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể kháng CD27 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ, kháng thể được làm giống người) bao gồm các CDR nêu dưới đây:

CDR-H1: GFIIKATYMH (SEQ ID NO: 83)

CDR-H2: RIDPANGETKYDPKFQV (SEQ ID NO: 84)

CDR-H3: YAWYFDV (SEQ ID NO: 85)

CDR-L1: RASENIYSFLA (SEQ ID NO: 86)

CDR-L2: HAKTLAE (SEQ ID NO: 87)

CDR-L3: QHYYGSPLT (SEQ ID NO: 88)

(xem WO2012/04367).

Do đó, sáng chế bao gồm chế phẩm chứa chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) kết hợp với pembrolizumab; cũng như các phương pháp để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư ở đối tượng bao gồm dùng lượng có hiệu quả của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 kết hợp

với pembrolizumab (ví dụ, pembrolizumab được định liều ở 200 mg ba tuần một lần) cho đối tượng. Tùy ý, đối tượng còn được dùng kết hợp với chất điều trị khác nữa.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được kết hợp với kháng thể pembrolizumab bao gồm chuỗi nặng globulin miễn dịch (hoặc CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của nó) chứa trình tự axit amin:
QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGG
INPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRF
DMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP
SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 89); và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (hoặc CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của nó) chứa trình tự axit amin:
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYL
ASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO: 90).

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được kết hợp với kháng thể

bao gồm chuỗi nặng globulin miễn dịch (hoặc CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của nó) chứa trình tự axit amin:
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 91); và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (hoặc CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của nó) chứa trình tự axit amin:
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 92).

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được kết hợp với một hoặc nhiều trong số bất kỳ: axit 13-cis-retinoic, 3-[5-(metylsulfonylpiperadinmetyl)-indolyl]-quinolon, 4-hydroxytamoxifen, 5-deooxyuridin, 5'-deoxy-5-flouridin, 5-flouraxil, 6-mecaptopurin, 7-hydroxystaurosporin, A-443654, abirateroneaxetat, abraxan, ABT-578, acolbifen, ADS-100380, aflibercept, ALT-110, altretamin, amifostin, aminoglutethimit, amrubicin, amsacrin, anagrelid, anastrozol, angiostatin, AP-23573, ARQ-197, arzoxifen, AS-252424, AS-605240, asparaginaza, ATI3387, AT-9263, atrasentan, axitinib, AZD1152, vacxin *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), batabulin, BC-210, besodutox,

bevacizumab, BGJ398, bicalutamit, Bio111, BIO140, BKM120, bleomyxin, BMS-214662, BMS-247550, BMS-275291, BMS-310705, bortezimib, buserelin, busulfan, calcitriol, camptothecin, canertinib, capecitabin, carboplatin, carmustin, CC8490, CEA (recombinant vaccinia-carcinoembryonic antigen vaccine: vacxin kháng nguyên bệnh đậu mùa-caxinom phôi tái tổ hợp), cediranib, CG-1521, CG-781, chlamydocin, chlorambucil, clotoxin, cilengitide, cimitidin, cisplatin, cladribin, clodronat, cobimetnib, COL-3, CP-724714, xyclophosphamit, cyproteron, cyproteroneaxetat, cytarabin, cytosinearabinosid, dabrafenib, dacarbazin, dacinostat, dactinomycin, dalotuzumab, danusertib, dasatanib, daunorubicin, decatanib, deguelin, denileukin, deoxycoformycin, depsipeptit, diarylpropionitril, diethylstilbestrol, diftitox, DNE03, docetaxel, dovitinib, doxorubicin, droloxifen, edotecarin, edotreotit được đánh dấu ytri-90, edotreotit, EKB-569, EMD121974, encorafenib, endostatin, enzalutamit, enzastaurin, epirubicin, epithilon B, ERA-923, erbitux, erlotinib, estradiol, estramustin, etoposit, everolimus, exemestan, ficlatuzumab, finasterit, flavopiridol, floxuridin, fludarabin, fludrocortison, fluoxymesteron, flutamit, chế độ trị liệu FOLFOX, fulvestrant, galeteron, ganetespib, gefitinib, gemcitabin, gimatecan, glucopyranosyl lipit A, goserelin, goserelin axetat, gossypol, GSK461364, GSK690693, HMR-3339, hydroxyprogesteronecaproat, hydroxyurea, IC87114, idarubicin, idoxyfen, ifosfamit, IM862, imatinib, IMC-1C11, imiquimod, INC280, INCB24360, INO1001, interferon, interleukin-2, interleukin-12, ipilimumab, irinotecan, JNJ-16241199, ketoconazol, KRX-0402, lapatinib, lasofoxifen, LEE011, letrozol, leucovorin, leuprolid, leuprolid axetat, levamisol, paclitaxel giữ trong liposom, lomustin, lonafarnib, lucanthon, LY292223, LY292696, LY293646, LY293684, LY294002, LY317615, LY3009120, marimastat, mechlorethamin, medroxyprogesteroneaxetat, megestrolaxetat, MEK162, melphalan, mercaptopurin, mesna, methotrexat, mithramycin, mitomycin, mitotan, mitoxantron, hỗn dịch (huyền phù) *Mycobacterium obuense* bị chết do nhiệt, tozasertib, MLN8054, natitoclax, neovastat, Neratinib, neuradiab, nilotinib, nilutimid, nolatrexed, NVP-BEZ235, oblimersen, octreotide, ofatumumab, oregovomab, ornatuzumab, orteronel, oxaliplatin, paclitaxel, palbociclib, pamidronat, panitumumab, pazopanib, PD0325901, PD184352,

PEG-interferon, pemetrexed, pentostatin, perifosin, phenylalanin mù tạt, PI-103, pictilisib, PIK-75, pipendoxifen, PKI-166, plicamycin, poly-ICLC, porfim, prednison, procarbazin, progestin, polysacarit gắn kết protein PSK (có nguồn gốc từ *Basidiomycete coriolus versicolor*), PLX8394, PX-866, R-763, raloxifen, raltitrexed, razoxin, ridaforolimus, rituximab, romidepsin, RTA744, rubitecan, scriptaid, Sdx102, seliciclib, selumetinib, semaxanib, SF1126, sirolimus, SN36093, sorafenib, spironolacton, squalamin, SR13668, streptozocin, SU6668, axit suberoylanalit hydroxamic, sunitinib, estrogen tổng hợp, talampanel, talimogen laherparepvec, tamoxifen, temozolomid, temsirolimus, teniposid, tesmilifen, testosteron, tetrandrin, TGX-221, thalidomid, 6-thioguanin, thiotepa, ticilimumab, tipifarnib, tivozanib, TKI-258, TLK286, TNF□ (yếu tố hoại tử khối u alpha - tumor necrosis factor alpha), topotecan, toremifen xitrat, trabectedin, trametinib, trastuzumab, tretinoin, trichostatin A, triciribinephosphat monohydrat, triptorelin pamoat, TSE-424, uraxil mù tạt, axit valproic, valrubicin, vandetanib, vatalanib, bẫy VEGF, vemurafenib, vinblastin, vincristin, vindesin, vinorelbin, vitaxin, vitespan, vorinostat, VX-745, wortmannin, Xr311, dịch chiết nước nóng Z-100 của *Bacillus tuberculosis*, zanolimumab, ZK186619, ZK-304709, ZM336372 hoặc ZSTK474.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được kết hợp với một hoặc nhiều chất chống nôn bao gồm, nhưng không giới hạn ở: casopitant (GlaxoSmithKline), Netupitant (MGI-Helsinn) và các chất đối kháng thụ thể NK-1 khác, palonosetron (được bán dưới tên gọi Aloxi của hãng MGI Pharma), aprepitant (được bán dưới tên gọi Emend của hãng Merck and Co.; Rahway, NJ), diphenhydramin (được bán dưới tên gọi Benadryl® của hãng Pfizer; New York, NY), hydroxyzin (được bán dưới tên gọi Atarax® của hãng Pfizer; New York, NY), metoclopramit (được bán dưới tên gọi Reglan® của hãng AH Robins Co,; Richmond, VA), lorazepam (được bán dưới tên gọi

Ativan® của hãng Wyeth; Madison, NJ), alprazolam (được bán dưới tên gọi Xanax® của hãng Pfizer; New York, NY), haloperidol (được bán dưới tên gọi Haldol® by Ortho-McNeil; Raritan, NJ), droperidol (Inapsine®), dronabinol (được bán dưới tên gọi Marinol® của hãng Solvay Pharmaceuticals, Inc.; Marietta, GA), dexametason (được bán dưới tên gọi Decadron® của hãng Merck và Co.; Rahway, NJ), metylprednisolon (được bán dưới tên gọi Medrol® của hãng Pfizer; New York, NY), prochlorperazine (được bán dưới tên gọi Compazine® của hãng Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), granisetron (được bán dưới tên gọi Kytril® của hãng Hoffmann-La Roche Inc.; Nutley, NJ), ondansetron (được bán dưới tên gọi Zofran® của hãng Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), dolasetron (được bán dưới tên gọi Anzemet® của hãng Sanofi-Aventis; New York, NY), tropisetron (được bán dưới tên gọi Navoban® của hãng Novartis; East Hanover, NJ).

Các tác dụng phụ khác của việc điều trị bệnh ung thư bao gồm thiếu hụt tế bào hồng cầu và bạch cầu. Do đó, theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được kết hợp với chất điều trị hoặc ngăn ngừa sự thiếu hụt này, như, ví dụ, filgrastim, PEG-filgrastim, erythropoietin, epoetin alfa hoặc darbepoetin alfa.

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được kết hợp với vacxin. Theo một phương án của sáng chế, vacxin là vacxin chống ung thư, vacxin peptit hoặc vacxin ADN. Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, vacxin là tế bào khối u (ví dụ, tế bào khối u được chiếu xạ) hoặc tế bào đuôi gai (ví dụ, tế bào đuôi gai tạo xung với peptit khối u).

Theo một phương án của sáng chế, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) được dùng kết hợp với quy trình điều trị. Quy trình điều trị gồm một hoặc nhiều bước được thực hiện bởi bác sỹ hoặc bác sỹ lâm sàng trong việc điều trị cho đối tượng nhằm làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng (ví dụ, của bệnh ung thư và/hoặc bệnh truyền nhiễm) ở đối tượng cần điều trị, bằng cách làm giảm dần hoặc triệt tiêu các triệu chứng hoặc bằng cách ức chế tiến triển của (các) triệu chứng, ví dụ, triệu chứng bệnh ung thư như sinh trưởng khối u hoặc di căn, bằng mức độ đo được về mặt lâm sàng bất kỳ.

Theo một phương án của sáng chế, quy trình điều trị là liệu pháp xạ trị chống ung thư. Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, liệu pháp xạ trị là liệu pháp xạ trị bằng chùm bức xạ bên ngoài (external beam therapy - EBT): phương pháp chiếu chùm tia X năng lượng cao đến vị trí khối u. Chùm bức xạ được tạo ra bên ngoài cơ thể bệnh nhân (ví dụ, bằng máy gia tốc tuyến tính) và được tạo đích ở vị trí khối u. Các tia X này có thể phá hủy tế bào ung thư và lên kế hoạch điều trị cẩn thận để các mô bình thường xung quanh được giữ lại. Không có nguồn phóng xạ nào được đặt bên trong cơ thể bệnh nhân. Theo một phương án của sáng chế, liệu pháp xạ trị là liệu pháp chùm bức xạ proton: một loại liệu pháp thích hợp để phá vỡ mô bệnh bằng proton thay vì tia X. Theo một phương án của sáng chế, liệu pháp xạ trị là liệu pháp xạ trị bằng chùm bức xạ bên ngoài thích hợp: quy trình sử dụng kỹ thuật tiên tiến để điều chỉnh liệu pháp xạ trị cho phù hợp với cấu trúc cơ thể của cá thể.

Theo một phương án của sáng chế, liệu pháp xạ trị là xạ trị bên trong (brachytherapy): đặt tạm thời các chất phóng xạ vào trong cơ thể, thường dùng để tạo ra liều phụ hoặc liều tăng lên của bức xạ đến vùng điều trị.

Theo một phương án của sáng chế, quy trình phẫu thuật dùng kết hợp với chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168;

F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) là phẫu thuật cắt bỏ khối u.

Dùng điều trị

Sáng chế bao gồm phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị ít nhất một bệnh hoặc rối loạn mà có thể được ngăn ngừa hoặc điều trị bằng cách sử dụng chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) theo sáng chế, tùy ý kết hợp với chất điều trị hoặc quy trình điều trị khác, phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần điều trị dùng lượng có hoạt tính dược của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3, và/hoặc dược phẩm chứa chất này.

"Điều trị" hoặc "việc điều trị" nghĩa là dùng chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177), cho đối tượng có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh mà chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 có hiệu quả, ví dụ, trong việc điều trị cho đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc bệnh truyền nhiễm, hoặc nghi ngờ mắc bệnh ung thư hoặc bệnh truyền nhiễm, để chất này có hoạt tính điều trị. Thông thường, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 được dùng ở "lượng có hiệu quả" hoặc "liều có hiệu quả" làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng (ví dụ, của bệnh ung thư hoặc bệnh truyền nhiễm) ở đối tượng cần điều trị hoặc cho mật độ dân cư, bằng cách làm giảm dần hoặc triệt tiêu các triệu chứng hoặc bằng cách làm ức chế tiến triển của (các) triệu chứng, ví dụ, các triệu chứng bệnh ung thư như sinh trưởng khối u hoặc di căn, bằng mức độ đo được về mặt lâm sàng bất kỳ. Lượng có hiệu quả của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh,

độ tuổi, và cân nặng của bệnh nhân, và khả năng của thuốc tạo ra đáp ứng mong muốn ở đối tượng.

Đối tượng cần điều trị có thể là động vật máu nóng bất kỳ, nhưng cụ thể là động vật có vú, và cụ thể hơn là người. Sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, đối tượng cần điều trị cụ thể là người mắc, hoặc có nguy cơ mắc, bệnh và rối loạn nêu ở đây. Nói chung, chế độ điều trị sẽ được theo dõi cho đến khi đạt được tác dụng điều trị mong muốn và/hoặc miễn là giữ được tác dụng điều trị mong muốn. Hơn nữa, bác sỹ lâm sàng có thể xác định được tác dụng này.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm bao gồm ít nhất trình tự axit amin, chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn), polypeptit hoặc hợp chất như mô tả ở đây, như F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177, và tùy ý ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng. Nói chung, các chế phẩm, chất mang, tá dược và chất pha loãng này có thể là như được mô tả trong các đơn sáng chế đã công bố của Ablynx N.V., như ví dụ WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 hoặc WO 2009/068627.

Để điều chế dược phẩm hoặc chế phẩm vô trùng của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177), chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 được trộn với chất mang hoặc tá dược dược dụng. Xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Các chế phẩm này là một phần của sáng chế.

Phạm vi theo sáng chế bao gồm chế phẩm khử nước, ví dụ, làm khô ở nhiệt độ thấp, chứa chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví

dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) hoặc dược phẩm của chúng bao gồm chất mang dược dụng nhưng về cơ bản thiếu nước.

Dạng bào chế của các chất điều trị và chẩn đoán có thể được điều chế bằng cách trộn với chất mang, tá dược, hoặc chất ổn định khả dụng ở dạng, ví dụ, bột khô lạnh, bột nhão (huyền phù đặc), dung dịch nước hoặc hỗn dịch nước (xem, ví dụ, Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Nói chung, để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh và rối loạn nêu ở đây và phụ thuộc vào bệnh hoặc rối loạn cụ thể được điều trị, hiệu lực và/hoặc thời gian bán thải của protein dung hợp cụ thể hoặc cấu trúc được sử dụng, cách dùng cụ thể và dược phẩm hoặc chế phẩm cụ thể được sử dụng, kháng thể miền đơn và polypeptit theo sáng chế thường được dùng ở lượng nằm trong khoảng giữa 1 gam và 0,01 microgam mỗi kg thể trọng mỗi ngày, tốt hơn là giữa 0,1 gam và 0,1 microgam mỗi kg thể trọng mỗi ngày, như khoảng 1, 10, 100 hoặc 1000 microgam mỗi kg thể trọng mỗi ngày, dùng liên tục (ví dụ, bằng cách truyền), ở dạng liều đơn hằng ngày hoặc ở dạng đa phân liều trong ngày. Bác sỹ lâm sàng thường sẽ có thể xác định liều dùng hằng ngày thích hợp, phụ thuộc vào các yếu tố nêu ở đây. Cũng rõ ràng là trong các trường hợp cụ thể, bác sỹ lâm sàng có thể chọn lượng khác với các lượng này, ví dụ, dựa vào các yếu tố nêu trên và kinh nghiệm của anh ta. Nói chung, có thể thu được một số hướng dẫn về lượng dùng từ các lượng thường dùng cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể thông thường tương đương

dựa vào cùng đích dùng theo cùng đường về cơ bản, tuy nhiên tính đến cả sự khác biệt về ái lực/ái lực toàn phần, hiệu quả, sự phân bố sinh học, thời gian bán thải và các yếu tố tương tự đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Đường dùng của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) cho đối tượng có thể thay đổi. Các đường dùng bao gồm qua đường miệng, trực tràng, qua niêm mạc, trong ruột, ngoài đường tiêu hóa; trong cơ, dưới da, trong da, trong tủy, nội tủy mạc, trực tiếp trong thất, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong mũi, trong mắt, xông hít, bơm, dùng tại chỗ, da, áp da, hoặc trong động mạch.

Bác sỹ lâm sàng xác định liều thích hợp, ví dụ, bằng cách sử dụng các thông số hoặc yếu tố đã biết hoặc nghi ngờ trong tình trạng kỹ thuật để tác động đến việc điều trị. Nói chung, khi xác định liều, liều bắt đầu với lượng nào đó ít hơn liều tối đa và sau đó tăng lên từng lượng nhỏ cho đến khi đạt được tác dụng mong muốn hoặc tối ưu so với tác dụng phụ tiêu cực bất kỳ. Việc xác định triệu chứng quan trọng bao gồm các triệu chứng, ví dụ, viêm hoặc mức độ xytokin viêm sản sinh. Nói chung, mong muốn là sinh vật sẽ được lấy từ cùng loài như động vật được tạo đích để điều trị, từ đó tối thiểu hóa đáp ứng miễn dịch bất kỳ đối với chất phản ứng. Trong trường hợp đối tượng người, ví dụ, kháng thể khảm, được làm giống người và đầy đủ có thể được mong muốn. Hướng dẫn lựa chọn liều thích hợp của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, F023700924 hoặc F023700931) là khả dụng (xem, ví dụ, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792;

Beniaminovitz *et al.* (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602).

Triệu chứng bệnh được giảm nhẹ có thể được bác sỹ lâm sàng bất kỳ hoặc chuyên gia trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe khác đánh giá về mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng. Theo một phương án của sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc vật phẩm sản xuất) có thể không có hiệu quả làm giảm (các) triệu chứng bệnh đích ở mọi đối tượng, nó cần làm giảm (các) triệu chứng đích ở một số đáng kể các đối tượng về mặt thống kê như được xác định bằng thử nghiệm thống kê đã biết trong tình trạng kỹ thuật như thử nghiệm (kiểm định) t Student, thử nghiệm chi^2, thử nghiệm U theo Mann and Whitney, thử nghiệm Kruskal-Wallis (thử nghiệm H), thử nghiệm Jonckheere-Terpstra và thử nghiệm Wilcoxon.

Vì chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) có khả năng gắn kết với PD1 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn), cụ thể là chúng có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, bệnh ung thư di căn, khối u rắn, bệnh ung thư máu, bệnh bạch cầu, u lympho, sacom xương, sacom cơ vân, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư tế bào chuyển tiếp của bể thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư Wilm, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư cổ, sacom màng hoạt dịch, bệnh ung thư đầu và cổ, caxinom tế bào vảy, bệnh đa u tủy, bệnh ung thư tế bào thận, u nguyên bào võng mạc, u nguyên bào gan, caxinom tế bào gan, u hắc sắc tố, khối u dạng que ở thận, sacom Ewing, sacom sụn, bệnh ung thư não, u nguyên bào đệm, u màng não, u tuyến yên, u thần kinh tiền đình, u thần kinh ngoại bì nguyên thủy, u nguyên bào tủy, u bào hình sao, u bào hình sao giảm biệt hóa, u thần kinh đệm ít nhánh, u màng não thất, u nhú đám rối màng mạch, đa hồng cầu nguyên phát, bệnh tăng tiểu cầu, bệnh xơ tủy tự

phát, sacom mô mềm, bệnh ung thư tuyến giáp, ung thư nội mạc tử cung, ung thư xuất phát từ các tế bào thần kinh nội tiết (carcinoid cancer) hoặc ung thư gan, bệnh ung thư vú và bệnh ung thư dạ dày.

Các chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh truyền nhiễm như, ví dụ, nhiễm virut, nhiễm khuẩn, nhiễm nấm hoặc nhiễm ký sinh trùng. Theo một phương án của sáng chế, nhiễm virut là nhiễm virut được chọn từ nhóm bao gồm virut gây suy giảm miễn dịch ở người (human immunodeficiency virus - HIV), virut ebola, virut viêm gan (A, B, hoặc C), virut herpes (ví dụ, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II, và CMV, virut Epstein Barr), adenovirut, virut cúm, flavivirut, echovirut, rhinovirut, virut coxsackie, coronavirut, virut hợp bào hô hấp, virut quai bị, rotavirut, virut sởi, virut gây bệnh sởi Đức (rubella), parvovirut, virut gây bệnh đậu mùa, virut HTLV, virut dengue, papillomavirut, virut u mềm, poliovirut, virut gây bệnh dại, virut JC hoặc virut viêm não arbovirut. Theo một phương án của sáng chế, nhiễm khuẩn là nhiễm vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Chlamydia*, vi khuẩn ký sinh nội bào rickettsia, vi khuẩn mycobacteria, staphylococci, streptococci, pneumonococci, meningococci và gonococci, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, *Legionella*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella*, bacilli, *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetan*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthricis*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, và *Borriella*. Theo một phương án của sáng chế, nhiễm nấm là nhiễm nấm được chọn từ nhóm bao gồm *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, *v.v..*), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, *v.v..*), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* và *Histoplasma capsulatum*. Theo một phương án của sáng chế, nhiễm ký sinh trùng là nhiễm vật ký sinh được chọn từ nhóm bao gồm *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, *Giardia lambia*, *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Sáng chế còn bao gồm các phương pháp để:

- ức chế LAG3 gắn kết với phân tử MHC lớp II;
- cạnh tranh với phân tử MHC lớp II đối với sự gắn kết LAG3;
- gắn kết chất gắn kết LAG3, ví dụ, chất gắn kết PD1/LAG3, với riêng LAG3 trên bề mặt của tế bào T CD4+ và/hoặc CD8+ đã hoạt hoá;
- ức chế việc homodime hoá LAG3; và/hoặc
- kích thích sự sản sinh IL-2 bởi tế bào T đặc hiệu kháng nguyên

trong cơ thể đối tượng bằng cách dùng chất gắn kết PD1/LAG3 (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177) cho đối tượng; hoặc *in vitro* bằng cách cho LAG3 tiếp xúc với chất gắn kết PD1/LAG3. Các tác động này có thể qua trung gian chất gắn kết LAG3. Do đó, các phương pháp này cũng có thể được thực hiện với chất gắn kết bất kỳ bao gồm chất gắn kết LAG3.

Sáng chế còn bao gồm các phương pháp để:

- phong bế sự gắn kết giữa PD1 và PD-L1 và/hoặc PD-L2
- gắn kết chất gắn kết PD1, ví dụ, chất gắn kết PD1/LAG3, với tế bào B và/hoặc tế bào T
- phong bế sự ức chế tế bào T qua trung gian PD1, sự chết tế bào T theo chương trình và/hoặc giảm chức năng tế bào T

trong cơ thể đối tượng bằng cách dùng chất gắn kết PD1/LAG3 (ví dụ, F023700924 hoặc F023700931) cho đối tượng; hoặc *in vitro* bằng cách cho PD1 tiếp xúc với chất gắn kết PD1/LAG3. Các tác động này có thể qua trung gian chất gắn kết PD1. Do đó, các phương pháp này cũng có thể được thực hiện với chất gắn kết bất kỳ bao gồm chất gắn kết PD1.

Sáng chế còn bao gồm các phương pháp làm tăng thời gian bán thải của chất gắn kết, như chất gắn kết PD1 và/hoặc:LAG3 bằng cách dung hợp chất gắn kết với chất gắn kết kháng albumin huyết thanh người như ALB11002.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị bệnh và rối loạn nêu trên, bao gồm dùng cho đối tượng cần điều trị (nghĩa là, mắc một trong số các bệnh nêu trên) lượng có hiệu quả điều trị của chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) theo sáng chế (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177). Sáng chế còn đề cập đến chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 theo sáng chế để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị một trong số các bệnh hoặc rối loạn nêu trên.

Chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc F023701177), polypeptit, hợp chất, và polynucleotit (ví dụ, vectơ) mô tả ở đây đặc biệt được dùng cho hệ tuần hoàn. Chúng có thể được dùng theo cách thích hợp bất kỳ cho phép chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3, polypeptit, hợp chất, và polynucleotit vào hệ tuần hoàn, như trong tĩnh mạch, qua tiêm hoặc truyền, hoặc theo cách thích hợp khác (bao gồm dùng qua đường miệng, dùng dưới da, dùng trong cơ, dùng qua da, dùng trong mũi, dùng qua phổi, *v.v.*.) cho phép chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3, polypeptit, hợp chất, và polynucleotit vào hệ tuần hoàn. Các phương pháp và đường dùng thích hợp sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, hơn nữa, ví dụ còn từ kiến thức trong các đơn sáng chế đã công bố của Ablynx N.V., như ví dụ WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 hoặc WO 2009/068627.

Sáng chế còn đề xuất dụng cụ tiêm bao gồm chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 bất kỳ (ví dụ, ISVD như kháng thể miền đơn) (ví dụ, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172; hoặc

F023701177), polypeptit hoặc polynucleotit nêu ở đây hoặc dược phẩm của chúng. Dụng cụ tiêm là dụng cụ đưa chất vào cơ thể bệnh nhân theo cách dùng ngoài đường tiêu hoá, ví dụ, trong cơ, dưới da hoặc trong tĩnh mạch. Ví dụ, dụng cụ tiêm có thể là ống tiêm (ví dụ, đã chứa dược phẩm, như máy tiêm tự động), ví dụ, bao gồm xy lanh hoặc khoang để giữ chất lỏng được tiêm (ví dụ, bao gồm chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 hoặc dược phẩm của chúng), kim để đâm vào da và/hoặc mạch máu để tiêm chất lỏng; và pittông để đẩy chất lỏng ra khỏi xy lanh và đi qua lỗ kim. Theo một phương án của sáng chế, dụng cụ tiêm bao gồm chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 hoặc dược phẩm của chúng là dụng cụ tiêm trong tĩnh mạch (IV). Dụng cụ này bao gồm chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 hoặc dược phẩm của chúng trong ống thông dò hoặc dùi chọc/kim mà có thể được gắn với ống mà có thể được gắn với túi hoặc khoang chứa để giữ chất lỏng (ví dụ, nước muối; hoặc dung dịch ringer lactat chứa NaCl, natri lactat, KCl, $CaCl_2$ và tùy ý bao gồm glucoza) được đưa vào cơ thể của đối tượng qua ống thông dò dùi chọc/kim. Chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 hoặc dược phẩm của chúng có thể, theo một phương án của sáng chế, được đưa vào dụng cụ khi dùi chọc và ống thông dò được lồng vào tĩnh mạch của đối tượng và dùi chọc được loại bỏ khỏi ống thông dò đã lồng vào. Dụng cụ IV có thể, ví dụ, được lồng vào tĩnh mạch ngoại biên (ví dụ, ở bàn tay hoặc cánh tay); tĩnh mạch chủ trên hoặc tĩnh mạch chủ dưới, hoặc trong tâm nhĩ phải của tim (ví dụ, IV trung tâm); hoặc vào dưới xương đòn, tĩnh mạch cảnh trong, hoặc tĩnh mạch đùi và, ví dụ, hướng đến tim cho đến khi nó đạt đến tĩnh mạch chủ trên hoặc tâm nhĩ phải (ví dụ, ống thông tĩnh mạch trung tâm). Theo một phương án của sáng chế, dụng cụ tiêm là máy tiêm tự động; máy tiêm tia hoặc bơm truyền dịch bên ngoài. Máy tiêm tia sử dụng tia phun chất lỏng hẹp ở áp suất cao xuyên qua biểu bì để đưa chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 hoặc dược phẩm của chúng vào cơ thể bệnh nhân. Bơm truyền dịch bên ngoài là dụng cụ y tế để phân phối chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 hoặc dược phẩm của chúng vào cơ thể bệnh nhân ở lượng được kiểm soát. Bơm truyền dịch bên ngoài có thể dùng năng lượng điện hoặc cơ. Các bơm khác nhau vận hành theo các cách khác nhau, ví dụ, bơm ống tiêm giữ chất lỏng trong khoang chứa của ống tiêm, và pittông di chuyển được điều chỉnh sự phân phối chất lỏng, bơm làm bằng chất dẻo giữ chất lỏng trong khoang chứa bong

bóng kéo căng được, và áp suất từ thành chất dẻo của bong bóng điều khiển sự phân phối chất lỏng. Trong bơm nhu động, bộ trục lăn kẹp chặt theo chiều dài của ống mềm, đẩy chất lỏng về phía trước. Trong bơm đa kênh, chất lỏng có thể được phân phối từ nhiều khoang chứa ở nhiều tốc độ.

Cần lưu ý rằng các hình vẽ, danh mục trình tự bất kỳ và phần ví dụ thử nghiệm/ví dụ thực hiện sáng chế chỉ nhằm minh họa sáng chế và không nên hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế và/hoặc yêu cầu bảo hộ kèm theo theo cách bất kỳ, trừ khi có quy định khác nêu ở đây.

Các khía cạnh, phương án, ưu điểm và ứng dụng khác theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng nhờ phần mô tả tiếp ở đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phần ví dụ thực hiện sáng chế nhằm mục đích minh hoạ sáng chế nhưng không làm giới hạn sáng chế. Các chế phẩm và phương pháp nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế tạo nên một phần của sáng chế.

Ví dụ 1: Kháng thể miền đơn đơn trị PD-1 của người gắn kết với CHO.Hpd-1

Sự gắn kết với PD-1 của người do tế bào biểu hiện được đánh giá trên các tế bào CHO biểu hiện quá mức PD-1 của người. Dãy pha loãng (theo bậc) kháng thể miền đơn được chuẩn bị trong đệm thử nghiệm: PBS/10% FBS/0,05% natri azit. $1x10^5$ tế bào/lỗ được chuyển vào đĩa đáy chữ V có 96 lỗ và tái tạo huyền phù trong 100µL dịch pha loãng kháng thể miền đơn. Sau 30 phút ủ ở 4°C, các tế bào được rửa bằng 100µL/lỗ đệm thử nghiệm và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của 1 µg/ml kháng FLAG (Sigma, F1804) hoặc kháng HIS (AbD Serotec, MCA 1396). Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa bằng 100 µL/lỗ đệm thử nghiệm, và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của 5 µg/ml kháng thể dê kháng IgG chuột được đánh dấu PE (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071). Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa, và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của dung dịch TOPRO3 5 nM (LifeTechnologies, T3606) trước khi phân tích trên FACS CANTO II (BD). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig. 5.

Ví dụ này chứng minh rằng kháng thể miền đơn đơn trị kháng PD-1 người F023700706 liên kết với PD-1 của người theo cách tương tự với kháng thể miền đơn đơn trị F023700275 có nguồn gốc từ đó.

Ví dụ 2: Kháng thể miền đơn LAG-3 đơn trị của người gắn kết với 3A9.hLAG-3

Sự gắn kết với LAG-3 của người do tế bào biểu hiện được đánh giá trên các tế bào 3A9 biểu hiện quá mức LAG-3 của người. Dãy pha loãng kháng thể miền đơn được chuẩn bị trong đệm thử nghiệm: PBS/10% FBS/0,05% natri azit. $1x10^5$ tế bào/lỗ được chuyển vào đĩa đáy chữ V có 96 lỗ và tái tạo huyền phù trong 100 µL dịch pha loãng kháng thể miền đơn. Sau 30 phút ủ ở 4°C, các tế bào được rửa bằng 100 µL/lỗ đệm thử nghiệm và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của 1 µg/ml kháng FLAG (Sigma, F1804). Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa bằng 100 µL/lỗ đệm thử nghiệm và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của 5 µg/ml kháng thể dê kháng IgG chuột được đánh dấu PE (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071). Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa, và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của dung dịch TOPRO3 5 nM (LifeTechnologies, T3606) trước khi phân tích trên FACS CANTO II (BD). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig. 6.

Ví dụ này chứng minh rằng kháng thể miền đơn đơn trị kháng LAG-3 người tối ưu hóa trình tự F023700842 gắn kết với LAG-3 của người theo cách tương tự với kháng thể miền đơn đơn trị F02376611B09 gốc có nguồn gốc từ đó.

Ví dụ 3: Kháng thể miền đơn đa đặc hiệu chứa kháng thể miền đơn PD-1 của người gắn kết với CHO.hPD-1 và 3A9.rhesusPD-1

Sự gắn kết với PD-1 của người và PD-1 của khỉ rhesus do tế bào biểu hiện được đánh giá trên các tế bào CHO biểu hiện quá mức PD-1 của người và các tế bào 3A9 biểu hiện quá mức PD-1 của khỉ nâu (khỉ rhesus), tương ứng. Dãy pha loãng kháng thể miền đơn được chuẩn bị trong đệm thử nghiệm: PBS/10% FBS/0,05% natri azit. $1x10^5$ tế bào/lỗ được chuyển vào đĩa chữ V có 96 lỗ và tái tạo huyền phù trong 100 µL dịch pha loãng kháng thể miền đơn. Sau 30 phút ủ ở 4°C, các tế bào được rửa bằng 100 µL/lỗ đệm thử nghiệm và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của 3 µg/ml ABH0074, kháng thể đơn dòng mà nhận diện albumin gắn kết nhóm kéo dài thời gian bán thải kháng thể miền

đơn. Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa bằng 100 µL/lỗ đệm thử nghiệm, và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của 5 µg/ml kháng thể dê kháng IgG chuột được đánh dấu PE (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071). Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của dung dịch TOPRO3 5 nM (LifeTechnologies, T3606) trước khi phân tích trên FACS CANTO II (BD). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig. 7 (A-B).

Ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người F023700931 và F023700924 liên kết với PD 1 của người và PD-1 của khỉ nâu. Các đối chứng đặc hiệu đơn, hóa trị hai kháng PD-1 người F023700933 và kháng LAG-3 người F023700962 cũng được thể hiện.

Ví dụ 4: Kháng thể miền đơn đa đặc hiệu chứa kháng thể LAG-3 của người gắn kết với CHO.hLAG3 và CHO.rhesus/cynoLAG3

Sự gắn kết với LAG-3 ở người và ở động vật linh trưởng không phải người do tế bào biểu hiện (miền ngoại bào là giống nhau giữa khỉ cynomolgus và khỉ nâu; do đó, gen là nói đến LAG-3 của khỉ nâu/khỉ cyno) được đánh giá trên các tế bào CHO biểu hiện quá mức LAG-3 của người và khỉ nâu/khỉ cyno. Dãy pha loãng kháng thể miền đơn được chuẩn bị trong đệm thử nghiệm: PBS/10% FBS/0,05% natri azit. $1x10^5$ tế bào/lỗ được chuyển vào đĩa chữ V có 96 lỗ và tái tạo huyền phù trong 100 µL dịch pha loãng kháng thể miền đơn. Sau 30 phút ủ ở 4°C, các tế bào được rửa bằng 100 µL/lỗ đệm thử nghiệm và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của 1-3 µg/ml ABH0074, kháng thể đơn dòng mà nhận ra albumin gắn kết nhóm kéo dài thời gian bán thải của kháng thể miền đơn. Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa bằng 100 µL/lỗ đệm thử nghiệm, và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của 5 µg/ml kháng thể dê kháng IgG chuột được đánh dấu PE (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071). Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của dung dịch TOPRO3 5 nM (LifeTechnologies, T3606) trước khi phân tích trên FACSArray (BD). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig. 8 (A-B).

Ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người F023700931 và F023700924 liên kết với cả LAG-3 của người và LAG-

3 của khỉ nâu/khỉ cynomolgous. Các đối chứng đặc hiệu đơn, hóa trị hai kháng PD-1 người F023700933 và kháng LAG-3 người F023700962 cũng được thể hiện.

Ví dụ 5: Thử nghiệm phong bế PD-L1-Fc và PD-L2-Fc sinh học

Các thử nghiệm cạnh tranh phối tử được thực hiện trên các tế bào CHO biểu hiện quá mức PD-1 của người. Dãy pha loãng kháng thể miền đơn được chuẩn bị trong đệm thử nghiệm: PBS/10% FBS/0,05% natri azit. Dãy pha loãng kháng thể miền đơn năm lần được thực hiện bắt đầu từ 1 µM (2x) và pha loãng trước với 11 nM (2x) PD-L1-hFc của người hoặc 29 nM (2x) PD-L2-hFc của người trong tổng thể tích 220 µL. $2x10^4$ tế bào/lỗ được gieo mầm trong đĩa chữ V có 96 lỗ và tái tạo huyền phù trong 200 µL/lỗ của dịch pha loãng kháng thể miền đơn/phối tử. Sau khi ủ 90 phút ở 4°C, các tế bào được rửa bằng 100 µL/lỗ đệm thử nghiệm và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ kháng thể dê kháng IgG người được đánh dấu PE (Southern Biotech, 2043-09). Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C, rửa, và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của dung dịch TOPRO3 5 nM (LifeTechnologies, T3606) trước khi phân tích trên FACS CANTO II (BD). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig. 9 (A-H).

Ví dụ này chứng minh rằng modun đơn trị kháng thể miền đơn kháng PD-1 người F023700706 liên kết với PD-1 của người và phong bế hoàn toàn sự tương tác của nó với PD-L1 (Fig. 9 (A)) và PD-L2 (Fig. 9 (B)) giống với modun đơn trị F023700275 gốc mà nó được tạo ra từ đó. Ngoài ra, ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người F023700931 và F023700924 liên kết với PD-1 của người và phong bế hoàn toàn sự tương tác của chúng với PD-L1 (Fig. 9 (C)) và PD-L2 (Fig. 9 (D)). Các đối chứng được tối ưu hóa trình tự, đặc hiệu đơn, hóa trị hai, kháng PD-1 người F023700933 và kháng LAG-3 người F023700962, cũng được thể hiện (Fig. 9 (E-F)). Cuối cùng, ví dụ này chứng minh rằng các biến thể axit amin bổ sung của modun đơn trị kháng thể miền đơn kháng PD-1 người F023700929 liên kết với PD-1 của người và phong bế hoàn toàn sự tương tác của nó với PD-L1 (Fig. 9 (G)) và PD-L2 (Fig. 9 (H)). Cần lưu ý là F023700706 và F023700929 là thực thể kháng thể miền đơn đơn trị kháng PD-1 người giống như protein dung hợp FLAG3-HIS6 hoặc giống như protein dung hợp HIS6, tương ứng.

Ví dụ 6: Thử nghiệm phong bế LAG-3-Fc sinh học

Các thử nghiệm cạnh tranh phối tử được thực hiện trên các tế bào Daudi của người mà thể hiện sự biểu hiện nội sinh cao của phức hợp tương thích mô chính trên bề mặt (major histocompatibility complex - MHC) lớp II (Class II). Dãy pha loãng kháng thể miền đơn được chuẩn bị trong đệm thử nghiệm: HBSS/2% FBS. Trước khi thí nghiệm, các thụ thể Fc trên các tế bào Daudi được phong bế bằng sự phong bế Fc của người (BD Pharmingen, 564220) và 5 µg/mL IgG của dê (Jackson ImmunoResearch, 005-000-003) trong 30 phút ở 4°C. Dãy pha loãng kháng thể miền đơn năm lần được thực hiện bắt đầu từ 2 µM (2x) và pha loãng trước với 80 nM (2X) LAG-3-hFc của người trong tổng thể tích 120 µL. $1X10^5$ tế bào/lỗ được gieo mầm trong đĩa chữ V có 96 lỗ và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của dịch pha loãng kháng thể miền đơn/phối tử. Sau 30 phút ủ ở 4°C, các tế bào được rửa và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ kháng thể dê kháng IgG người được đánh dấu PE (Southern Biotech, 2043-09). Các mẫu được ủ trong 15 phút ở 4°C, rửa, và tái tạo huyền phù trong 100 µL/lỗ của dung dịch TOPRO3 5 nM (LifeTechnologies, T3606) trước khi phân tích trên FACS CANTO II (BD). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig. 10 (A-C).

Ví dụ này chứng minh rằng modun đơn trị của kháng thể miền đơn kháng LAG-3 người F023700842 gắn kết với LAG-3 của người và phong bế hoàn toàn sự tương tác của nó với MHC lớp II giống với kháng thể miền đơn đơn trị F0237611B09 gốc mà nó được tạo ra từ đó (Fig. 10 (A)). Ngoài ra, ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700931 và F023700924 gắn kết với LAG-3 của người và phong bế hoàn toàn sự tương tác của nó với MHC lớp II (Fig. 10 (B-C)). Các đối chứng đặc hiệu đơn, hóa trị hai kháng PD-1 người F023700933 và kháng LAG-3 người F023700962 cũng được thể hiện.

Ví dụ 7: Thử nghiệm dime hóa gần

Thử nghiệm dime hóa gần được sử dụng dựa trên hệ thống thử nghiệm bổ trợ mảnh enzym beta-galactosidaza. Thử nghiệm này sử dụng protein dung hợp được tạo ra bằng thẻ có tên ProLink (PK) và protein bổ trợ trong đó protein chất nhận enzym (EA) được dung hợp với protein thứ hai. Các tế bào U2OS được chuyển nhiễm ổn định với

miền ngoại bào của LAG-3 (1-477) dung hợp với cấu trúc dưới phân tử EA và miền ngoại bào của PD-1 (1-199) dung hợp với cấu trúc dưới phân tử PK. Dòng tế bào U2OS.LAG3(1-477)-EA.PD1(1-199)-PK #9 được dàn bốn lần với 5.000 tế bào/lỗ trong môi trường dàn DiscoverX CP5 trên đĩa 384 lỗ. Tế bào được để gắn trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ cacbon dioxit 5%.Loạt pha loãng 1:3, 11 điểm của mẫu kháng thể miền đơn sau đó được bổ sung vào tế bào và được ủ qua đêm (16 giờ) ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ cacbon dioxit 5%. Chất phản ứng phát hiện PathHunter được thêm vào các lỗ, ủ trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối, và sau đó đĩa được đọc trên quang kế Envision. Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig.11 (A-B).

Ví dụ này chứng minh rằng kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700931 đồng thời liên kết với PD-1 của người và LAG-3 của người được biểu hiện trong màng tế bào do mang cấu trúc dưới phân tử PK và EA lại gần nhau tạo ra phức hợp enzym có hoạt tính để tạo ra tín hiệu ánh sáng (Fig.11 (A)). Các đối chứng đặc hiệu đơn, hóa trị hai kháng PD-1 người F023700933 riêng lẻ và kháng LAG-3 người F023700962 riêng lẻ không thể liên kết với cả hai đích đồng thời và do đó không tạo ra tín hiệu ánh sáng. Các modun riêng lẻ trong kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700931 được liên kết với nhóm liên kết Glyxin-Serin dài 35 axit amin (35GS). Kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023701016 và F023701017 chứa modun PD-1 và LAG-3 đồng nhất là F023700931 nhưng nhóm liên kết Glyxin-Serin giữ tất cả modun trong các cấu trúc dài 20 axit amin (20GS) hoặc dài 9 axit amin (9GS), tương ứng. Ví dụ này thể hiện sự rút ngắn nhóm liên kết Glyxin-Serin từ 35GS đến 9GS có tác động rất nhỏ đến khả năng liên kết đồng thời cả hai đích trên màng tế bào và tạo ra tín hiệu ánh sáng. Nói chúng, các số liệu này thể hiện rằng kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700931 có thể gắn kết đồng thời cả hai đích, nếu cả hai đích được biểu hiện bởi cùng tế bào.

Ví dụ này cũng chứng minh rằng kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700924 đồng thời liên kết với PD-1 của người và LAG-3 của người được biểu hiện trong màng tế bào (Fig.11 (B)). Các modun riêng lẻ trong kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700924 được liên kết với nhóm liên

kết Glyxin-Serin là dài 35 axit amin (35GS). Kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700969 và F023700970 chứa các modun PD-1 và LAG-3 đồng nhất là F023700924 nhưng nhóm liên kết Glyxin-Serin giữa tất cả modun trong cấu trúc dài 20 axit amin (20GS) hoặc dài 9 axit amin (9GS), tương ứng. Ví dụ này thể hiện rằng sự rút ngắn nhóm liên kết Glyxin-Serin từ 35GS đến 9GS có tác động rất nhỏ đến khả năng gắn kết đồng thời cả hai đích và tạo ra tín hiệu ánh sáng. Nói chung, các số liệu này thể hiện rằng kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700924 có thể gắn kết đồng thời cả hai đích, nếu cả hai đích được biểu hiện bởi cùng tế bào.

Ví dụ 8: Thử nghiệm Jurkat.hPD-1.IL2luc + THP-1.PD-L1 được xử lý kỹ thuật (được thao tác di truyền)

Dòng vô tính DT999A1 là dòng vô tính tế bào Jurkat biểu hiện gen chuyển PD-1 với gen chỉ thị luciferaza trung gian IL-2 (Jurkat.hPD-1.IL2luc). Jurkat.hPD-1.IL2luc được phát triển trong môi trường RPMI (Corning Cellgro 10-040-CV) + 10% FBS bị bất hoạt bởi nhiệt (Hyclone SH30910.03) + 2 mM L-glutamin (Cellgro 25-005-CI) + 2 ug/ml puromyxin (Sigma P9620) + 0,5 mg/ml Genetixin (Gibco 10131-027). Tế bào được tách hai lần mỗi tuần sau khi gieo tế bào $2x10^5$ tế bào/ml và được tách khi mật độ vượt quá $1x10^6$ tế bào/ml. Tế bào THP-1 biểu hiện gen chuyển PD-L1 (THP-1.PD-L1) được phát triển trong môi trường RPMI + 10% FBS bị bất hoạt bởi nhiệt + 2 mM L-glutamin+ 0,5 ug/ml puromyxin. Tế bào được tách hai lần mỗi tuần sau khi gieo $3x10^5$ tế bào/ml và được tách khi chúng đạt đến $1x10^6$ tế bào/ml.

Thử nghiệm sinh học thiết lập bằng cách sử dụng Môi trường thử nghiệm (Môi trường RPMI không chứa phenol đỏ (Gibco 11835-030) + 10% FBS được thẩm tách (Hyclone, SH30079.03). Albumin của người (Sigma, A8763) được chuẩn bị là gốc 600 uM. 4X (120 uM) dung dịch được chuẩn bị bằng cách sử dụng môi trường thử nghiệm và 25 uL được bổ sung vào các đĩa được xử lý nuôi cấy tế bào có vách ngăn màu trắng (Costar 3903). Pha loãng các kháng thể miền đơn bằng cách sử dụng môi trường thử nghiệm để đạt được 4X nồng độ ban đầu. Tạo ra sáu loạt pha loãng 10 lần kháng thể miền đơn. Bổ sung 25 ul chuẩn độ kháng thể miền đơn vào đĩa được xử lý nuôi cấy tế bào có vách màu trắng chứa albumin. Ủ kháng thể miền đơn + albumin trong 20-30 phút

ở nhiệt độ trong phòng. Thu tế bào THP-1.PD-L1 vào bình T-75, quay tế bào, và tái huyền phù trong 10 ml môi trường thử nghiệm. Đếm huyền phù tế bào và điều chỉnh để tạo ra huyền phù tế bào $4x10^6$tế bào/ml. Thu tế bào Jurkat.hPD-1.IL2luc vào bình T-75, ly tâm tế bào, và tái huyền phù trong 10 ml môi trường thử nghiệm. Đếm huyền phù tế bào và điều chỉnh để tạo ra huyền phù tế bào Jurkat.hPD-1.IL2luc $1x10^6$ tế bào/ml. Trộn thể tích tế bào THP-1.PD-L1 + tế bào Jurkat.hPD-1.IL2luc bằng nhau. Bổ sung 2 ng/ml LPS (2X) và 100 ng/ml IFN-g (2x) vào huyền phù được trộn. Bổ sung 50 uL huyền phù tế bào bao gồm điều kiện kích thích [IFN-g (hệ thống R&D 285-IF/CF) + LPS (Sigma L4391)] vào kháng thể miền đơn chuẩn độ. Ủ tế bào với kháng thể miền đơn chuẩn độ đến xấp xỉ 22 giờ trong tủ ủ. Kết thúc 22 giờ, cẩn thân bổ sung 10 ul 55 ng/ml kháng thể kháng CD3 (BD Pharmingen 555336; 11X dung dịch làm việc) và để trong tủ ủ thêm hai giờ. Kết thúc hai giờ ủ, dán băng trắng (Perkin Elmer 6005199) vào dưới đáy đĩa và bổ sung 100 ul chất phản ứng One-Glo (Promega E6120). Ủ bằng cách lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 3 phút. Đọc đĩa trên bộ đọc đĩa có thể đọc phát quang với thời gian đính gắn bằng 0,1 giây. Số liệu thô theo RLU (Đơn vị ánh sáng tương đối) có thể được vẽ đồ thị trực tiếp hoặc được vẽ đồ thị bằng số lần thay đổi trong tín hiệu luciferaza thu được bằng cách chia các lỗ xử lý cho các lỗ không chứa kháng thể miền đơn. Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig.12 (A-E).

Ví dụ này chứng minh rằng modun đơn trị kháng thể miền đơn PD-1 kháng người, F023700706, liên kết với PD-1 của người được biểu hiện bởi dòng tế bào T, phong bế tương tác của PD-1 với PD-L1 được biểu hiện bởi dòng tế bào đồng nuôi cấy để làm giảm sự ức chế PD-L1 cung cấp cho tế bào T; theo đó, cho phép tế bào T đáp ứng ở mức cao hơn, đến chất chủ vận thụ thể tế bào T dựa trên việc ức chế sự ức chế qua trung gian PD-L1 (Fig.12 (A)). Hơn nữa, ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700931 và F023700924 liên kết với PD-1 của người được biểu hiện bởi dòng tế bào T, phong bế tương tác của PD-1 với PD-L1; theo đó, cho phép tế bào T đáp ứng ở mức cao hơn đến chất chủ vận thụ thể tế bào T dựa trên việc ức chế sự ức chế qua trung gian PD-L1 (Fig.12 (B)). Đối chứng đặc hiệu đơn, hóa trị hai kháng PD-1 người F023700933 và kháng LAG-3 người F023700962 cũng được thể hiện.

Ngoài ra, ví dụ này thể hiện rằng kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700969 và F023700970 chứa các nhóm liên kết 20GS hoặc 9GS, tương ứng, có hiệu lực tương tự là phân tử F023700924 gốc chứa các nhóm liên kết 35GS (Fig.12 (C)). Tương tự, kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023701016 và F023701017 chứa các nhóm liên kết 20GS hoặc 9GS, tương ứng, có hiệu lực tương tự là phân tử F023700931 gốc chứa các nhóm liên kết 35GS (Fig.12 (D)). Hơn nữa, ví dụ này chứng minh rằng các biến thể axit amin bổ sung của modun đơn trị kháng thể miền đơn kháng PD-1 của người tối ưu hóa trình tự F023700706 liên kết với PD-1 của người được biểu hiện bởi dòng tế bào T, phong bế tương tác của PD-1 với PD-L1; theo đó, cho phép tế bào T đáp ứng ở mức cao hơn đến chất chủ vận thụ thể tế bào T dựa trên việc ức chế sự ức chế qua trung gian PD-L1 (Fig.12 (E)).

Ví dụ 9: Thử nghiệm PBMC của người được hoạt hóa bởi SEB

Tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi của người (PBMC) được làm tan trong RPMI hoàn chỉnh (đầy đủ) với 10% huyết thanh của người (RPMI 1640 Glutamax (Thermo Fisher Scientific, catalog 11875085), 1X Penixilin-Streptomyxin (Thermo Fisher Scientific, catalog 15140148), 1X beta-mercaptoetanol (Thermo Fisher Scientific, catalog 21985023), 1X HEPES (Thermo Fisher Scientific, catalog 15630080), 1X natri pyruvat (Thermo Fisher Scientific, catalog 11360070), 1X axit amin không thiết yếu (Thermo Fisher Scientific, catalog 11140076), huyết thanh của người (Sigma, catalog H4522-100ML lot#SLBP2783V). Tạo huyền phù đối với 2,5E6 tế bào/mL và chia 100 uL vào đĩa 96 lỗ đáy chữ U 2,5E5 tế bào/lỗ. Các kháng thể miền đơn được pha loãng lần lượt bằng cách sử dụng loạt pha loãng 3 lần đến 4X dung dịch gốc làm việc được chuẩn bị và tạo ra đường cong đáp ứng liều 6 điểm. Bổ sung 50 uL dung dịch kháng thể miền đơn vào các lỗ và ủ 15-30 phút ở nhiệt độ trong phòng trong khi chuẩn bị dung dịch ngoại độc tố khuẩn cầu chuỗi B (SEB). SEB gốc (Toxin Technology Inc, catalog BT202) được chuẩn bị bằng cách chuyển lại thành SEB ở 1 mg/mL trong nước cất và được làm đông ở nhiệt độ -80°C. 2 uM dung dịch làm việc được tạo ra bằng cách bổ sung 2 ul dung dịch gốc mỗi mL môi trường và 2 uM dung dịch làm việc được pha loãng lần lượt bằng cách sử dụng loạt pha loãng 10 lần để tạo ra đường cong chuẩn độ. Bổ sung 50 uL vào

các lỗ thích hợp để tạo ra đường cong chuẩn độ là chuẩn nội để xác định thử nghiệm thực hiện như mong đợi và để xác định đáp ứng tối thiểu mà có thể suy ra từ các chất cho khác nhau. 2 uM dung dịch làm việc SEB được pha loãng thành 40 nM SEB và 50 uL được bổ sung vào lỗ để kích thích PBMC (nồng độ cuối cùng của SEB là 10 nM). Ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 38°C và 5% CO_2. Chuyển 100 uL dịch nổi phía trên vào đĩa 96 lỗ sạch và pha loãng 1:2 để phân tích IL-2 bằng cách sử dụng kit IL-2 của người MSD V-plex (MesoScale Discovery, K151QQD-1). Phần còn lại được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig.13 (A-R).

Ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người F023700931 và F023700924 tăng lên đến mức IL-2 tăng sau khi kích thích bằng chất chủ vận thụ thể tế bào T đối với tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) thu được từ nhiều chất (nguồn) cho (A-R).

Ví dụ 10: Thử nghiệm phản ứng tế bào lympho được chọn (MLR)

Tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi của người (PBMC) được tinh chế từ các túi bạch cầu (leukopack) và được làm lạnh xuống trong máy làm lạnh bằng nitơ lỏng. PBMC của người đã lạnh được làm tan, được pha loãng trong RPMI hoàn chỉnh (RPMI+10% huyết thanh của người), được ly tâm ở 4500 m/s^2 trong 5 phút, và giọt nhỏ tế bào được tái huyền phù bằng RPMI hoàn chỉnh (môi trường Gibco RPMI 1640 (Thermofisher Scientific; 11875-119); huyết thanh của người (Sigma-Aldrich; H4522-100 mL). Bạch cầu đơn nhân được làm giàu bằng cách sử dụng Kit làm giàu bạch cầu đơn nhân của người (công nghệ STEMCELL; 19059). Tế bào được chuyển vào đĩa 6 lỗ chứa $1x10^6$ tế bào/ml (5 ml/lỗ) trong RPMI hoàn chỉnh chứa 100 ng/ml GM-CSF (Hệ thống R&D; 215-GM-110) và 50 ng/ml IL-4 của người (Hệ thống R&D; 204-IL-010/CF). Bạch cầu đơn nhân được ủ ở nhiệt độ 37^0C trong 5 ngày để cho phép biệt hóa tế bào đuôi gai (dendritic cell - DC). Tế bào đuôi gai thu được từ bạch cầu đơn nhân (Mo-DC) được thu vào ngày 6, được đếm, và được sử dụng trong thử nghiệm MLR làm chất kích thích.

Vào ngày bắt đầu thí nghiệm, PBMC của người đã lạnh được làm tan và được pha loãng hai lần trong RPMI hoàn chỉnh chứa penixilin/streptomyxin. Tế bào T CD4 từ mỗi chất cho được làm giàu bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào T CD4 của người EasySep

(công nghệ STEMCELL; 17952). Tế bào T CD4 được phân lập được tạo huyền phù $1x10^6$ tế bào/ml trong RPMI hoàn chỉnh. Mo-DC được trộn tỷ lệ 1:10 ($1x10^5$ tế bào/ml) với tế bào T $CD4^+$ ($1x10^6$ tế bào/ml) và hỗn hợp tế bào được dải trên đĩa 96 lỗ đáy chữ U với 200 ul/lỗ. Các kháng thể miền đơn được pha loãng lần lượt bằng cách sử dụng loạt pha loãng 4 lần và 5X dung dịch gốc làm việc được chuẩn bị. 50 µL mỗi lần pha loãng được thêm vào 200 µL nuôi cấy để tạo ra 1X nồng độ cuối cùng của kháng thể miền đơn/kháng thể. Dịch nổi nuôi cấy được thu thập vào ngày 5 sau khi bắt đầu thí nghiệm để định lượng IFNγ bằng cách sử dụng Panel I tiền viêm của người V-plex (Mesoscale Discovery; K15052D-1). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig.14 (A-F).

Ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể miền đơn PD-1/LAG-3 đặc hiệu kép kháng người F023700931 và F023700924 tăng đến mức IFN-gama tăng sau đó kích thích tế bào T CD4 sơ cấp bằng Mo-DC khác loại thu được từ các chất cho khác nhau (a-f).

Ví dụ 11: Thử nghiệm 3A9.hLAG-3 được xử lý kỹ thuật

3A9.hLAG3 là gen chuyển LAG-3 của người biểu hiện khối lai tế bào T 3A9 ở chuột nhắt. LK35.2 (ATCC; HB-98) là khối lai tế bào B ở chuột nhắt mà mang phân tử $I\text{-}Ad^k$ và $I\text{-}Ed^k$ bề mặt có kháng nguyên đặc hiệu (nghĩa là, peptit lysozym trong trứng gà mái (HEL) DGSTDYGILQINSRWW) với lớp II hạn chế khối lai tế bào T 3A9. Đếm tế bào 3A9.hLAG3 và tái huyền phù với $4x10^6$ tế bào/ml môi trường sạch [RPMI (Invitrogen, 61870-036) + 10% FBS + Pen Strep]. Đếm tế bào LK35.2 và tái huyền phù với $1x10^6$ tế bào/ml môi trường mới. Bổ sung 25 µL tế bào 3A9.hLAG3 (tế bào 1E5) vào các lỗ trong đĩa nuôi cấy tế bào đáy phẳng 96 lỗ (Corning 3610). Chuẩn bị 4X (200 uM) dung dịch albumin của người (Sigma, A8763) và bổ sung 25 µL vào tế bào. Kháng thể miền đơn được pha loãng đến 5X nồng độ trong môi trường hoàn chỉnh và bổ sung 20ul 5X kháng thể miền đơn vào tế bào. Ủ tế bào 3A9.hLAG3 bằng kháng thể miền đơn trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C.

Chuẩn bị 500 µM dung dịch gốc peptit HEL (peptit thông thường GenScript) và được bảo quản ở nhiệt độ -20C. Pha loãng dung dịch gốc peptit HEL 1:20 (25 uM) trong

môi trường nuôi cấy tế bào và sau đó được pha loãng thêm peptit HEL 1:833 trên tế bào LK35.2 (nồng độ HEL cuối cùng = ~30 nM). Ủ tế bào LK35.2 với peptit trong 30 phút ở nhiệt độ 37˚C. Bổ sung 33 µL tế bào LK35.2 được xử lý bởi peptit vào đĩa 96 lỗ chứa kháng thể miền đơn được xử lý tế bào 3A9.hLAG-3. Ủ nuôi cấy ở nhiệt độ 37ºC trong 24 giờ. Các đĩa được quay 3000 m/s^2 trong 5 phút và được thu dịch nổi để phân tích IL-2 (IL-2 Mesoscale V-Plex; Mesoscale K152QQD-4). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig.15 (A-D).

Ví dụ này chứng minh rằng modun đơn trị của kháng thể miền đơn kháng LAG-3 người F023700842 gắn kết với LAG-3 của người được biểu hiện bởi dòng tế bào T, đã phong bế tương tác LAG-3 với MHC lớp II được biểu hiện bởi dòng tế bào đồng nuôi cấy để làm giảm sự ức chế MHC lớp II cung cấp tế bào T; theo đó, cho phép tế bào T đáp ứng ở mức cao hơn đến chất chủ vận thụ thể tế bào T dựa trên việc ức chế sự ức chế qua trung gian MHC lớp II. Hiệu lực ức chế MHC lớp II bằng modun đơn trị của kháng thể miền đơn kháng LAG-3 người F023700842 giống với của kháng thể miền đơn F023700656 gốc mà nó được tạo ra từ đó (Fig.15 (A)). Hơn nữa, ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người F023700931 và F023700924 gắn kết với LAG-3 của người được biểu hiện bởi dòng tế bào T, đã phong bế tương tác LAG-3 với MHC lớp II; theo đó, cho phép tế bào T đáp ứng ở mức cao hơn đến chất chủ vận thụ thể tế bào T dựa trên việc ức chế sự ức chế qua trung gian MHC lớp II (Fig.15 (B)). Các đối chứng đặc hiệu đơn, hóa trị hai kháng PD-1 người F023700933 và kháng LAG-3 người F023700962 cũng được thể hiện. Ngoài ra, ví dụ này thể hiện rằng kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700969 và F023700970 chứa các nhóm liên kết 20GS hoặc 9GS, tương ứng, có hiệu lực tương tự như phân tử F023700924 gốc chứa các nhóm liên kết 35GS (Fig.15 (C)). Tương tự, kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023701016 và F023701017, chứa các nhóm liên kết 20GS hoặc 9GS, tương ứng, có hiệu lực tương tự với phân tử F023700931 gốc chứa các nhóm liên kết 35GS (Fig.15 (D)).

Ví dụ 12: Thử nghiệm sinh học Jurkat.hPD-1.LAG-3 đặc hiệu kép được xử lý kỹ thuật

Sự tạo thành các tế bào Jurkat.LAG-3.PD-1 (DT1088- Dòng vô tính G10PD1)

Gen chuyển LAG-3 của người được đưa vào tế bào Jurkat (Je6.2.11) sử dụng hệ thống phân phối retrovirut với puromyxin là gen đánh dấu chọn lọc. Sự pha loãng giới hạn được thực hiện để chọn dòng vô tính (DT1088G10) với sự biểu hiện LAG-3 và CD3 tối ưu. Gen chuyển PD-1 của người được đưa vào dòng vô tính DT1088G10 sử dụng hệ thống phân phối Lentivirut với Gentixin là gen đánh dấu chọn lọc. Tế bào được chọn FACS để biểu hiện LAG-3 và PD-1 cao. Sự thu gom tế bào được chọn được duy trì và được cấy truyền trong môi trường RPMI hoàn chỉnh [RPMI (Corning 10-040-CV) được bổ sung 10% FBS (Hyclone SH30910.03) + 1 mM natri pyruvat (BioWhittaker, 13-115E) + 2 mM L-glutamin (Corning CellGro, 25-005-CI) + 10 mM HEPES (Corning, 26-060-CI) + 1X axit amin không thiết yếu (Sigma, M7145) + 0,2 ug/ml puromyxin (Sigma P9620), + 0,5 mg/ml G418 (Gibco 10131-027)].

Sự tạo thành tế bào biểu hiện Raji.PD-L1

Gen chuyển PD-L1 của người được đưa vào tế bào Raji (ATCC CCL-86) bằng cách sử dụng hệ thống phân phối retrovirut với puromyxin là gen đánh dấu chọn lọc. Các tế bào được lọc để làm giàu biểu hiện PD-L1 và Class-II (nội sinh). Tập hợp tế bào được làm giàu được duy trì và được cấy truyền trong môi trường RPMI hoàn chỉnh (môi trường RPMI được bổ sung 10% Hyclone FBS + 2 mM L- glutamin + 10 mM HEPES + 0,25 ug/ml puromyxin).

Độc tố SED gốc được chuẩn bị bằng cách tái cấu tạo SED (Công nghệ độc tố DT303) ở 1 mg/ml trong nước cất vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Các tế bào Raji.PD-L1 được nạp lại độc tố bằng cách ủ huyền phù chứa $0,87X10^6$ tế bào Raji-PD-L1/ml với độc tố SED (1,3X = 130 ng/ml, 100 ng/ml cuối) trong môi trường RPMI chứa 10% FBS được thẩm tách (Hyclone SH30079.03) trong 30 phút trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C. Huyền phù chứa $8X10^6$ tế bào Jurkat.LAG-3.PD-1/ml trong môi trường RPMI chứa 10% FBS được thẩm tách được chuẩn bị. Kháng thể miền đơn được chuẩn bị khi chuẩn độ liều 4 lần, 8 điểm (12X=120 µg/ml) của kháng thể miền đơn với nồng độ thử nghiệm ban đầu bằng 10 ug/ml.

45 ul huyền phù tế bào Jurkat.LAG-3.PD-1 ($8X10^6$ tế bào/ml) được ủ bằng 45 ul kháng thể miền đơn chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút trong đĩa đáy tròn (Corning 3359). Kết thúc 30 phút, 36 uL albumin của người (Sigma, A8763; 15X = 450 uM đạt đến nồng độ thử nghiệm cuối cùng chứa 30 uM) được thêm vào hỗn hợp Jurkat.LAG-3.PD-1 + Kháng thể miền đơn. 115 ul tế bào Raji.PD-L1 được nạp SED được bổ sung vào các đĩa thử nghiệm (Thermoscientific #167008). 35 uL hỗn hợp chứa Jurkat.LAG-3.PD-1+Các kháng thể miền đơn+albumin được xếp lớp cẩn thận vào tế bào Raji.PD-L1 được nạp SED. Các đĩa thử nghiệm được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ 5% CO_2. Sau 24 giờ ủ, 75 uL dịch nổi được chuyển vào đĩa (Corning# 3605) và được làm đông ở nhiệt độ -80°C. Các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng kit MSD IL-2 V-plex (Dụng cụ Mesoscale Cat#K151QQD). Các giá trị EC50 được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad prism. Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig.16 (A-B).

Ví dụ này chứng minh rằng các kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người F023700931 và F023700924 liên kết với cả PD-1 của người và LAG-3 của người được biểu hiện bởi dòng tế bào T, đã phong bế tương tác của PD-1 với PD-L1, phong bế tương tác LAG-3 với MHC lớp II; theo đó, cho phép tế bào T đáp ứng đến mức độ cao hơn đến chất chủ vận thụ thể tế bào T dựa trên việc ức chế sự ức chế kép qua trung gian PD-L1 và sự ức chế qua trung gian MHC lớp II (Fig.16 (A)). Đối chứng đặc hiệu đơn, hóa trị hai kháng PD-1 người F023700933 và kháng LAG-3 người F023700862 chỉ có thể phong bế một trong hai cơ chế ức chế riêng lẻ dẫn đến tế bào T đáp ứng theo cách phù hợp hơn đến chất chủ vận thụ thể tế bào T. Ngoài ra, ví dụ này thể hiện rằng kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700969 và F023700970 chứa các nhóm liên kết 20GS hoặc 9GS, tương ứng, có hiệu lực tương tự đối với phân tử F023700924 gốc chứa các nhóm liên kết 35GS. Tương tự, kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023701016 và F023701017 chứa các nhóm liên kết 20GS hoặc 9GS, tương ứng, có hiệu lực tương tự như phân tử F023700931 gốc chứa các nhóm liên kết 35GS (Fig.16 (B)).

Ví dụ 13: Thử nghiệm dòng vô tính tế bào T của người + JY.hPD-L1

Sự tạo thành và nuôi cấy dòng vô tính tế bào T CD4+ của người

Dòng tế bào vô tính T CD4+ đặc hiệu dị kháng nguyên MHC lớp II BC4-49 được tạo ra bằng 2 vòng phản ứng bạch cầu được trộn với dòng JY tế bào B được biến nạp EBV và được nhân dòng bởi sự pha loãng giới hạn. Dòng vô tính được kích thích lại bằng dị kháng nguyên đặc hiệu ở khoảng thời gian mỗi 2 tuần và được nuôi cấy trong môi trường Yssel (IMDM, Gibco 12440-053; AB huyết thanh của người, Gemimi 100512; penixilin/streptomyxin, Mediatech 30-002-CI; albumin của người, Sigma A9080; ITS-X, Gibco 51500056; Transferin, Roche 10652202001; PA Bioxtra Sigma p5585; LA-OA-Albumin, Sigma L9655). PBMC mới được phân lập từ hai lớp bạch-tiểu cầu của người được cung cấp bởi Stanford Blood Center và được thu gom với tỷ lệ tế bào 1:1. PBMC được chiếu xạ trong máy chiếu bức xạ gama ở liều 4000 rad trước khi sử dụng. Tế bào JY kiểu dại được chuẩn bị và được chiếu xạ ở liều 5000 rad. Các dòng tế bào vô tính T được nuôi cấy bằng vật nuôi trong đĩa 24 lỗ với 1mL mỗi lỗ có nồng độ cuối cùng chứa 0,2X10^6/mL tế bào T CD4+, được chiếu xạ PBMCs 1X10^6/mL, được chiếu xạ JY 0,1X10^6/mL, và 100 ng/mL PHA (Sigma L9017). Il-2 tái tổ hợp ở người (Hệ thống R&D; 202-IL/CF) được bổ sung nồng độ cuối cùng chứa 100 ng/mL vào ngày 3 sau khi kích thích lại, và được làm đầy lại mỗi 3-4 ngày trong suốt quá trình mở rộng. Tế bào được cấy truyền vào nồng độ tối ưu giữa 0,5-1,0X10^6/mL. Vào ngày 7 sau khi kích thích lại, mức độ phong phú của LAG-3 và mức độ trung bình của PD-1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào T.

Thử nghiệm chức năng tế bào T CD4+ của người

Các tế bào T CD4+ dị kháng nguyên đặc hiệu được thu từ đĩa nuôi cấy 24 lỗ vào ngày 7 sau khi kích thích lại kháng nguyên, sau đó được rửa hai lần bằng 20 mL PBS (Hyclone, SH3002802) chứa 2 mM EDTA (Invitrogen, 15575-38) bằng cách ly tâm. Các viên nhỏ được tái huyền phù vào huyền phù tế bào đơn trong môi trường Yssel. Kháng thể miễn đơn thử nghiệm được chuẩn độ bằng dãy pha loãng 5 lần trong môi trường Yssel bắt đầu từ nồng độ cao nhất bằng 133 nM với tổng 7 lượt pha loãng trong thể tích 100 µL trong đĩa nuôi cấy đáy chữ U 96 lỗ (Falcon, 353077). Năm mươi microlit huyền phù tế bào T ở mật độ 4 X 10^5 tế bào/mL được bổ sung vào các lỗ chứa kháng thể miễn

đơn đã chuẩn độ. Hỗn hợp kháng thể miền đơn/tế bào T được ủ trước trong 1 giờ trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO_2. Tế bào JY biểu hiện gen chuyển PD-L1 của người (JY.hPD-L1) được sử dụng trong nuôi cấy đồng thời tạo ra dị kháng nguyên đặc hiệu. Tế bào JY.hPD-L1 được nuôi cấy trong bình phản ứng T-75 (Thermo Scientific , 156499) trong môi trường RPMI (Corning Cellgro, 10-040-CV) với 10% FCS được thu và được chiếu xạ trong máy chiếu bức xạ gama ở liều 5000 rad, sau đó được rửa hai lần bằng PBS chứa 2 mM EDTA bằng cách ly tâm. Viên nhỏ được tái tạo huyền phù trong môi trường Yssel, và được lọc bằng bộ lọc tế bào 40 µm trước khi cấy. 50 µL/lỗ của huyền phù JY.hPD-L1 ở nồng độ 2 X 10^5 tế bào/mL được phân tán vào hỗn hợp kháng thể miền đơn-tế bào T được ủ trước, với tỷ lệ tế bào T với tế bào JY.hPD-L1 là 2:1. Tất cả các điều kiện được tiến hành gấp đôi. Sau khi nuôi cấy khoảng 3 ngày, 100 µL dịch nổi mỗi lỗ được thu để định lượng IFNγ của người. ELISA trên IFNγ của người được thực hiện để đánh giá mức IFNγ trên dịch nổi chung từ bản sao bằng cách sử dụng kit hIFNγ Quantikine kit (R&D Systems, SIF50). Thử nghiệm được thực hiện theo phương pháp chuẩn được cung cấp bởi nhà sản xuất. Giá trị EC50 được tính toán sử dụng phần mềm GraphPad prism. Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig.17 (A-C).

Ví dụ này chứng minh rằng kháng thể miền đơn kháng PD 1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700931 và F023700924 liên kết với cả PD-1 của người và LAG 3 của người biểu hiện bởi dòng vô tính tế bào T, đã phong bế tương tác của PD-1 với PD-L1, đã phong bế tương tác LAG-3 với MHC lớp II; theo đó, cho phép tế bào T đáp ứng đến mức độ cao hơn đến sự kích thích khác loại dựa trên việc ức chế kép qua trung gian PD-L1 và sự ức chế qua trung gian MHC lớp II (Fig.17 (A)). Các đối chứng đặc hiệu đơn, hoá trị hai kháng PD-1 người F023700933 và kháng LAG-3 người F023700862, chỉ có thể phong bế một trong hai cơ chế ức chế riêng rẽ dẫn đến đáp ứng tế bào T, theo cách bình thường hơn nhiều, với sự kích thích khác loại. Ngoài ra, ví dụ này thể hiện rằng kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700969 và F023700970, chứa các nhóm liên kết 20GS hoặc 9GS, tương ứng, có hiệu lực tương tự như phân tử F023700924 gốc chứa các nhóm liên kết 35GS (Fig.17 (C)). Tương tự,

kháng thể miền đơn kháng PD-1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023701016 và F023701017, chứa các nhóm liên kết 20GS hoặc 9GS, tương ứng, có hiệu lực tương tự như phân tử F023700931 gốc chứa các nhóm liên kết 35GS (Fig.17 (B)).

Ví dụ 14: Đánh giá về sự gắn kết của tiền kháng thể với F023700924 và F023700931

Sự gắn kết của các kháng thể đã có trước đó với kháng thể miền đơn giữ trên albumin huyết thanh người (HSA) được đánh giá bằng cách sử dụng ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). PBS/Tween (nước muối đệm phosphat, độ pH 7,4, 0,005% Tween 20) được sử dụng làm đệm thực hiện và thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C. Các dải phối tử của ProteOn GLC Sensor Chip được hoạt hoá bằng EDC/NHS (lưu lượng 30 µL/phút) và albumin huyết thanh người được tiêm ở 10 µg/ml trong đệm ProteOn Axetat độ pH 4,5 (lưu lượng 100µl/phút) tạo ra mức cố định xấp xỉ 3600 RU. Sau khi cố định, bề mặt được khử hoạt tính bằng etanolamin HCl (lưu lượng 30 µL/phút). Kháng thể miền đơn được tiêm trong 2 phút ở 45 µL/phút trên bề mặt HSA để tạo ra mức giữ kháng thể miền đơn xấp xỉ 600 RU đối với F023700924 hóa trị ba và xấp xỉ 1000RU đối với F023700931 hoá trị năm. Các mẫu chứa các kháng thể đã có trước đó được pha loãng 1:10 trong PBS-Tween20 (0,005%) trước khi được tiêm trong 2 phút ở 45 µl/phút sau đó là bước phân ly tiếp 400 giây. Sau mỗi chu kỳ (nghĩa là, trước bước giữ kháng thể miền đơn mới và bước tiêm mẫu máu), bề mặt HSA được tái sinh bằng cách tiêm 2 phút HCl (100mM) ở 45 µl/phút. Xử lý đồ thị cảm biến và phân tích số liệu được thực hiện bằng ProteOn Manager 3.1.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Đồ thị cảm biến thể hiện sự gắn kết kháng thể đã có trước đó thu được sau khi tham chiếu kép bằng cách trừ 1) phân ly kháng thể miền đơn-HSA và 2) gắn kết không đặc hiệu với dải phối tử đối chứng chỉ chứa HSA. Các mức gắn kết của các kháng thể đã có trước đó được xác định bằng cách thiết lập các điểm báo cáo ở 125 giây (5 giây sau khi kết thúc phối hợp). Để làm đối chứng, các mẫu chứa các kháng thể đã có trước đó cũng được thử nghiệm về sự gắn kết với kháng thể miền đơn hoá trị ba không biến đổi để làm giảm sự gắn kết của các kháng thể đã có trước đó này (T013700112). Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm này được nêu trên Fig.19 (A-I).

Kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người F023700924 có ba môđun kháng thể miền đơn (một môđun PD-1, một môđun LAG-3, và một môđun kháng albumin); trong khi đó, F023700931 có năm môđun kháng thể miền đơn (hai môđun PD-1, hai môđun LAG-3, và một môđun kháng albumin). Một thành phần của phương pháp tối ưu hoá trình tự là kết hợp sự thay thế axit amin vào khung kháng thể miền đơn làm giảm khả năng phản ứng có mặt trong huyết thanh người đối với môđun kháng thể miền đơn. Ví dụ này chứng minh khả năng phản ứng đã có trước đó được tìm thấy trong khoang huyết thanh của nguồn cho là người khoẻ mạnh với kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người 3-môđun F023700924 được giảm đi so với khả năng phản ứng đã có trước đó đối với cấu trúc kháng thể miền đơn 3-môđun T013700112 khác mà không chứa sự thay thế axit amin khung ở hai thời điểm. Khả năng phản ứng của kháng thể miền đơn đặc hiệu kép kháng PD-1/LAG-3 người 5-môđun F023700931 cao hơn F023700924 3-môđun (Fig.19 (A-B)). Ngoài ra, ví dụ này chứng minh khả năng phản ứng đã có trước đó tìm thấy trong khoang huyết thanh của bệnh nhân ung thư đối với kháng thể miền đơn PD-1/LAG-3 đặc hiệu kép kháng người 3-môđun F023700924 giảm đi so với khả năng phản ứng đã có trước đó đối với cấu trúc kháng thể miền đơn 3-môđun khác T013700112 mà không chứa sự thay thế axit amin khung ở hai thời điểm. Khả năng phản ứng của kháng thể miền đơn PD-1/LAG-3 đặc hiệu kép kháng người 5-môđun F023700931 là cao hơn 3-môđun F023700924 (Fig.19 (C-D)). Cuối cùng, khả năng phản ứng của khoang huyết thanh của bệnh nhân ung thư hướng đến F023700924 và F023700931 là khác nhau dựa vào dấu hiệu bệnh ung thư (Fig.19 (E-I)).

Ví dụ 15: Xác định ái lực của các kháng thể miền đơn tối ưu hóa trình tự LAG-3 của người bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Việc phân tích động lực học của kháng thể miền đơn được thực hiện bằng công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), sử dụng thiết bị Biacore T100 (GE Healthcare). HBS-EP+ (HEPES pH 7,4 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt P20) được sử dụng dưới dạng đệm thực hiện và thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C. Hai kênh dòng của chip cảm biến Series S CM5 được hoạt hóa bằng EDC (200 mM) /NHS (50 mM) và kháng IgG(Fc) của người (GE Healthcare,

BR100839) được tiêm ở 5 µg/ml trong đệm cố định đã nêu (10mM natri axetat pH 5,0) để tạo ra mức cố định xấp xỉ 2000 RU. Sau khi cố định, bề mặt được khử hoạt tính bằng etanolamin/HCl 1M (pH 8,5). Lưu lượng trong quá trình chuẩn bị cảm biến được thiết lập ở 5 µL/phút.

Trong phân tích động lực học, LAG3-hFc ở người 62,5 nM được tiêm trong 1 phút ở 10 µL/phút trên một bề mặt kháng IgG(Fc) của người để tạo ra mức thu giữ xấp xỉ 600 RU. Việc pha loãng 2,5 lần theo dãy của kháng thể miền đơn (nghĩa là, 5 µM xuống 3,3 nM cho F023700842) được tiến hành trong đệm thực hiện trước khi được tiêm trong 2 phút ở 45 µL/phút sau đó phân ly 900 giây tiếp theo. Sau mỗi chu kỳ (nghĩa là, trước bước thu giữ LAG3-hFc mới ở người và nạp (tiêm) kháng thể miền đơn) bề mặt kháng hIgG(Fc) được tái sinh bằng cách tiêm $MgCl_2$ (3M) 2 phút ở 10 µL/phút.

Việc xử lý đồ thị cảm biến và phân tích dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm đánh giá Biacore T100 Version 2.0,4 (GE Healthcare). Đồ thị cảm biến thể hiện sự gắn kết kháng thể miền đơn thu được sau khi tham chiếu kép bằng cách trừ 1) phân ly LAG3-hFc/kháng hIgG(Fc) của người và 2) gắn kết không đặc hiệu với kênh dòng đối chứng. Các đường cong đã xử lý được tính toán qua máy có mẫu 'Langmuir có vận chuyển khối lượng - Langmuir with Mass Transport'.

Ví dụ này chứng minh rằng kháng thể miền đơn đơn giá kháng LAG-3 của người F023700842 gắn kết với ái lực cao với LAG-3 của người.

Bảng E. Xác định ái lực của các kháng thể miền đơn LAG-3 của người bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

		ka (1/Ms)	ka (1/s)	KD (M)
F023700929	PD-1-Fc của người	2,0E+06	5,9E-04	2,9E-10
F023701192		2,5E+06	3,2E-03	1,3E-09
F023701193		3,2E+06	7,5E-03	2,4E-09
F023700842	LAG-3-Fc của người	9,2E+05	1,9E-02	2,1E-08
F023700924	Albumin huyết thanh người	6,4E+04	7,7E-03	1,2E-07
F023700931		3,2E+04	8,2E-03	2,5E-07
F023700924	Albumin huyết thanh khỉ rhesus	6,9E+04	7,9E-03	1,2E-07
F023700931		3,2E+04	8,4E-03	2,7E-07

Ví dụ 16: Xác định ái lực của các kháng thể miền đơn PD-1 tối ưu hóa trình tự ở người bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Việc phân tích động lực học của kháng thể miền đơn được thực hiện bằng công nghệ SPR, sử dụng thiết bị Biacore T100 (GE Healthcare). HBS-EP+ (HEPES pH 7,4 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt P20) được sử dụng dưới dạng đệm thực hiện và thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C. Hai kênh dòng của chip cảm biến Series S CM5 được hoạt hóa bằng EDC (200 mM) /NHS (50 mM). hPD-1-hFc được tiêm (4 lần) ở 5 µg/ml trong đệm cố định thích hợp (10mM natri axetat pH4,5) trên một bề mặt để tạo ra mức cố định 303 RU. Sau khi cố định, bề mặt được khử hoạt tính bằng etanolamin/HCl 1M (pH 8,5). Lưu lượng trong quá trình chuẩn bị cảm biến được thiết lập ở 5µl/phút.

Trong phân tích động lực học, việc pha loãng 2,5 lần theo dãy của kháng thể miền đơn (nghĩa là, 1µM xuống 0,46nM cho F023700929, F023701192 và F023701193) được tiến hành trong đệm thực hiện trước khi được tiêm trong 2 phút ở 45µl/phút sau đó phân ly 900 giây tiếp theo. Sau mỗi chu kỳ (nghĩa là, trước bước nạp kháng thể miền đơn mới) bề mặt hPD1-hFc được tái sinh bằng cách nạp Glyxin pH 1,5 10mM 1 phút ở 45µl/phút. Việc xử lý đồ thị cảm biến và phân tích dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm đánh giá Biacore T100 Version 2.0,4 (GE Healthcare). Đồ thị cảm biến thể hiện sự gắn kết kháng

thể miền đơn thu được sau khi tham chiếu kép bằng cách trừ 1) gắn kết không đặc hiệu với kênh dòng đối chứng và 2) nạp HBS-EP+. Các đường cong đã xử lý được tính toán bằng máy có mẫu 'Langmuir with Mass Transport'.

Ví dụ này chứng minh rằng kháng thể miền đơn đơn trị kháng PD-1 của người F023700929 gắn kết với ái lực cao với PD-1 của người. Ngoài ra, ví dụ này chứng minh rằng các biến thể axit amin bổ sung của F023700929 đơn giá kháng PD-1 của người tối ưu hóa trình tự (nghĩa là, F023701192 và F023701193) gắn kết với ái lực cao với PD-1 của người.

Bảng F. Xác định ái lực của các kháng thể miền đơn PD-1 ở người được tối ưu hóa trình tự bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

	ka (1/Ms)	T(ka)	kd (1/s)	T(kd)	Rmax (RU)	T(Rmax)	KD (M)	kt (RU/Ms)	Chi² (RU²)	Chi²/Rmax (%)
F023700929	2,0E+06	220	5,9E-04	150	32,0	500	2,9E-10	2,9E+15	1,8	5
F023701192	2,5E+06	63	3,2E-03	66	27,9	380	1,3E-09	8,7E+07	0,8	3
F023701193	3,2E+06	49	7,5E-03	49	29,5	450	2,4E-09	4,2E+07	1,2	4

Ví dụ 17: Xác định ái lực của PD-1/LAG-3 đa đặc hiệu ở người được tối ưu hóa trình tự đối với albumin của các loài khác bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Phân tích động học của kháng thể miền đơn được thực hiện bằng công nghệ SPR, sử dụng máy Biacore T100 (GE Healthcare). HBS-EP+ (0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% v/v chất có hoạt tính bề mặt P20) được sử dụng làm đệm thực hiện và thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C. Bốn kênh dòng của Series S Sensor Chip CM5 được hoạt hóa bằng EDC (200mM)/NHS (50mM) và albumin huyết thanh người (Sigma, cat. A3782, lot. SLBD7204V) hoặc albumin huyết thanh của khỉ rhesus (BioWorld, cat. 22070099-1,lot. L15091001DA) được tiêm ở 5µg/ml trong 10mM đệm natri axetat độ pH 4,5 để tạo ra các mức cố định giữa 179 và 312 RU trên ba kênh dòng, tương ứng. Sau khi cố định, các bề mặt được khử hoạt tính bằng 1M etanolamin/HCl (độ pH 8,5). Lưu lượng trong khi chuẩn bị cảm biến được đặt là 5µl/phút.

Trong phân tích động lực học, dãy pha loãng ba lần của kháng thể miền đơn (nghĩa là, 6µM xuống 2,7nM) được chuẩn bị trong đệm thực hiện trước khi được tiêm trong 2 phút ở 45µl/phút sau đó là phân ly 900 giây. Sau mỗi chu kỳ (nghĩa là, trước khi tiêm nồng độ kháng thể miền đơn mới), tất cả bề mặt được tái sinh bằng cách tiêm 10 giây 10mM Glyxin độ pH 1,5 ở 100µl/phút. Thực hiện xử lý đồ thị cảm biến và phân tích số liệu bằng phần mềm đánh giá Biacore T100 Version 2.0.4 (GE Healthcare). Đồ thị cảm biến thể hiện sự gắn kết kháng thể miền đơn thu được sau khi tham chiếu kép bằng cách trừ 1) gắn kết không đặc hiệu với kênh dòng đối chứng và 2) trung bình của hai lần tiêm HBS-EP+ trên kênh dòng cụ thể. Đánh giá đường cong đã xử lý cho phù hợp với mô hình 'Langmuir có vận chuyển khối lượng - Langmuir with Mass Transport'.

Ví dụ này chứng minh rằng kháng thể miền đơn kháng PD 1/LAG-3 người đặc hiệu kép F023700931 và F023700924 liên kết với cả albumin của người và albumin của khỉ rhesus với ái lực tương tự.

Bảng G. Xác định ái lực của PD-1/LAG-3 đa đặc hiệu ở người được tối ưu hóa trình tự đối với albumin của các loài khác bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

		HSA			RhSA			MSA		
Kháng thể miền đơn	Hóa trị	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
F023700924-CHO-EXPI	Trime	6,4E+04	7,7E-03	1,2E-07	6,9E+04	7,9E-03	1,2E-07	>5,0E+05	<6,0E-01	~1,9E-06
F023700931-CHO-EXPI	Pentame	3,2E+04	8,2E-03	2,5E-07	3,2E+04	8,4E-03	2,7E-07	>5,0E+05	<6,0E-01	~4,1E-06

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất gắn kết đa đặc hiệu bao gồm:

(a) miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) mà gắn kết với protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD1) bao gồm CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6; CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4 trong đó X là W hoặc V hoặc SEQ ID NO: 7; và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và

(b) ISVD mà gắn kết với gen hoạt hóa lympho bào 3 (LAG3) bao gồm CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65 hoặc các axit amin 6-10 của SEQ ID NO: 65; CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 66 hoặc các axit amin 1-10 của SEQ ID NO: 66; và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67.

2. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó ISVD mà gắn kết với PD1 bao gồm:

trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2 trong đó trình tự này bao gồm đột biến ở gốc 11 và/hoặc 89 và tùy ý thay thế Asp ở vị trí 1 bằng Glu; trong đó cách đánh số gốc này là cách đánh số gốc theo Kabat.

3. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó ISVD mà gắn kết với PD1 chứa trình tự axit amin

DVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAV ITWSGGITYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRPED TALYYCAGDK HQSSWYDYWG QGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 57, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến D1E);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 98, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến E1D);

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 99, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến E1D);

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 103, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến D1E và/hoặc N73S);

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDQSKNT
VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 104, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến D1E); hoặc

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDPSKNT
VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 105, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến D1E); hoặc

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITV
SGGITYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFY
DYWGQGTLVTVSS (các axit amin 1-119 của SEQ ID NO: 113, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến ME); hoặc

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITV
SGGITYYADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFY
DYWGQGTLVTVSS (các axit amin 1-119 của SEQ ID NO: 117, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến D1E); hoặc

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITV
SGGITYYADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFY
DYWGQGTLVTVSS (các axit amin 1-119 của SEQ ID NO: 121, hoặc trình tự này tùy ý chứa đột biến D1E).

4. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó ISVD mà gắn kết với LAG3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64 hoặc SEQ ID NO: 64 bao gồm sự thay thế Asp ở vị trí 1 bằng Glu.

5. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó chất gắn kết đa đặc hiệu còn bao gồm ISVD mà gắn kết với albumin huyết thanh người bao gồm CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 60 hoặc các axit amin 1-5 của SEQ ID NO: 60; CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61 hoặc các axit amin 1-10 của SEQ ID NO: 61; và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 62.

6. Chất gắn kết đa đặc hiệu bao gồm:

(a) miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) mà gắn kết với protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD1) bao gồm: CDR1 chứa trình tự axit amin IHAMG (SEQ-ID NO: 3) hoặc GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); CDR2 chứa trình tự axit amin VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; trong đó X là W hoặc V) hoặc VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7; trong đó X là W hoặc V); và CDR3 chứa trình tự axit amin DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, trong đó X là W hoặc F);

(b) miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch mà gắn kết với gen hoạt hóa lympho bào 3 (LAG3) bao gồm: CDR1 chứa trình tự axit amin GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65) hoặc DYVMG (các axit amin 6-10 của SEQ ID NO: 65); CDR2 chứa trình tự axit amin AISESGGRTHYADXKG (SEQ ID NO: 66) hoặc AISESGGRTH (các axit amin 1-10 của SEQ ID NO:66); và CDR3 chứa trình tự axit amin TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67); và,

(c) chất kéo dài thời gian bán thải và chất kéo dài đầu tận cùng C.

7. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 6, trong đó:

(a) miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch mà gắn kết với PD1 bao gồm trình tự axit amin

DVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAV ITWSGGITYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRPED TALYYCAGDK HQSSWYDYWG QGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 57);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 98);

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 99);

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSS

(các axit amin 1-119 của SEQ ID NO: 101);

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 103);

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDQSKNT
VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 104); hoặc

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDPSKNT
VYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 105); và,

(b) miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch mà gắn kết với LAG3 bao gồm trình tự axit amin

EVQLVE SGGGVVQPGG SLRLSCAASG RTFSDYVMGW FRQAPGKERE FVAAISESGG RTHYADSVKG
RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RPEDTALYYC ATTLLWWTSE YAPIKANDYD YWGQGTLVTV SS

(SEQ ID NO: 64); hoặc

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR
PEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSS

(các axit amin 1-128 của SEQ ID NO: 96).

8. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 6, trong đó chất kéo dài đầu tận cùng C là alanin.

9. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 6, trong đó chất gắn kết đa đặc hiệu này bao gồm:

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98;
- thành phần liên kết 35 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98;
- thành phần liên kết 35 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63;
- thành phần liên kết 35 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63;
- thành phần liên kết 35 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 35 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99;

- thành phần liên kết 35 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 20 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99;
- thành phần liên kết 20 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 20 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 20 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 9 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99;
- thành phần liên kết 9 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9 GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và

- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 20GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 20GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105 (trong đó Asp ở vị trí 1 được thay thế bằng Glu);
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;

- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105 (trong đó Asp ở vị trí 1 được thay thế bằng Glu);
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104 (trong đó Asp ở vị trí 1 được thay thế bằng Glu);
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104 (trong đó Asp ở vị trí 1 được thay thế bằng Glu);
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103 (trong đó Asn ở vị trí 73 được thay thế bằng Ser);
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:103 (trong đó Asp ở vị trí 1 được thay thế bằng Glu và Asn ở vị trí 73 được thay thế bằng Ser);
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103 (trong đó Asn ở vị trí 73 được thay thế bằng Ser);
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:103 (trong đó Asp ở vị trí 1 được thay thế bằng Glu và Asn ở vị trí 73 được thay thế bằng Ser);
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103 (trong đó Asn ở vị trí 73 được thay thế bằng Ser);
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C;

hoặc,

- PD1 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103 (trong đó Asn ở vị trí 73 được thay thế bằng Ser);
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- LAG3 ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64;
- thành phần liên kết 9GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125;
- HSA ISVD chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59; và
- Alanin đầu tận cùng C; và

  trong đó cách đánh số gốc này là cách đánh số gốc theo Kabat.

10. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 6, trong đó chất gắn kết đa đặc hiệu chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, hoặc 124.

11. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 6, trong đó chất kéo dài thời gian bán thải là ISVD albumin huyết thanh người mà gắn kết với albumin huyết thanh người bao gồm CDR1 chứa trình tự axit amin GFTFSSFGMS (SEQ ID NO: 60) hoặc SFGMS (các axit amin 1-5 của SEQ ID NO: 60); CDR2 chứa trình tự axit amin SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO: 61) hoặc SISGSGSDTL (các axit amin 1-10 của SEQ ID NO: 61); và CDR3 chứa trình tự axit amin GGSLSR (SEQ ID NO: 62).

12. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 11, trong đó ISVD mà gắn kết với albumin huyết thanh người chứa trình tự axit amin

EVQLVESGGG VVQPGNSLRL SCAASGFTFS SFGMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLY LQMNSLRPED TALYYCTIGG SLSRSSQGTL VTVSSA

(SEQ ID NO: 59).

13. Dụng cụ hoặc ống tiêm chứa chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 6, tùy ý kết hợp với chất điều trị khác.

14. Chế phẩm chứa chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 6 và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

15. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó chất gắn kết đa đặc hiệu chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, hoặc 124.

16. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó chất gắn kết đa đặc hiệu chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:110.

17. Chất gắn kết đa đặc hiệu chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, hoặc 124.

18. Chế phẩm chứa chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 17 và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

19. Chất gắn kết đa đặc hiệu chỉ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110.

20. Chế phẩm chứa chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 19 và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

21. Chất gắn kết đa đặc hiệu bao gồm chất gắn kết protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD1) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57 và chất gắn kết gen hoạt hóa lympho bào 3 (LAG3) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64.

22. Chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 21, trong đó chất gắn kết đa đặc hiệu còn bao gồm chất gắn kết albumin huyết thanh người (HSA) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:59.

23. Chất gắn kết đa đặc hiệu chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch đầu tận cùng N (ISVD) mà gắn kết với protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD1) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57; ISVD mà gắn kết với gen hoạt hóa lympho bào 3 (LAG3) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64; ISVD mà gắn kết với albumin huyết thanh người (HSA) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:59; và Alanin đầu tận cùng C.

24. Chất gắn kết đa đặc hiệu chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch đầu tận cùng N (ISVD) mà gắn kết với protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD1) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57; thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58; ISVD mà gắn kết với gen hoạt hóa lympho bào 3 (LAG3) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64; thành phần liên kết 35GS chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58; ISVD mà gắn kết với albumin huyết thanh người (HSA) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:59; và Alanin đầu tận cùng C.

25. Chế phẩm chứa chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 21 và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

26. Chất gắn kết đa đặc hiệu chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110.

27. Chế phẩm chứa chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 26 và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

28. Chế phẩm chứa chất gắn kết đa đặc hiệu theo điểm 24 và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

	Cách đánh số theo Chotia (VH)	Cách đánh số Aho	IMGT
11	11	12	12
14	14	15	15
41	41	48	46
42	42	49	47
87	87	101	99
89	89	103	101
108	108	144	---
110	110	146	---
112	112	148	---

Nguồn: http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/Numbering/NumFrame.html

FIG. 1

SEQ ID NO	Mô tả	Trình tự
1	WO 2008/071447, SEQ ID NO:348 (102C12)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS
2	Tham chiếu A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSS
3	CDR1 (Kabat)	IHAMG
4	CDR2 (Kabat)	VITWSGGITYYADSVKG
5	CDR3 (Kabat/Abm)	DKHQSSWYDY
6	CDR1 (Abm)	GSIASIHAMG
7	CDR2 (Abm)	VITWSGGITY
8	CDR3 (Kabat/Abm)	DKHQSSWYDY
9	Tham chiếu A (89T)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTATYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSS
10	Tham chiếu A (11V + 110K)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTATYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVKVSS
11	Tham chiếu A (11V + 110Q)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSS
12	Tham chiếu A (11V + 112K)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVKS
13	Tham chiếu A (11V + 112Q)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVQS

FIG.2-1

SEQ ID NO	Mô tả	Trình tự
14	Tham chiếu A (89L + 110K)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVKVSS
15	Tham chiếu A (89L + 110Q)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVQVSS
16	Tham chiếu A (89L + 112K)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVKS
17	Tham chiếu A (89L + 112Q)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVQS
18	Tham chiếu A (11V + 89L)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSS
19	Tham chiếu A (11V + 89L + 110K)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVKVSS
20	Tham chiếu A (11V + 89L + 110Q)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVQVSS
21	Tham chiếu A (11V + 89L + 112K)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVKS
22	Tham chiếu A (11V + 89L + 112Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVQS
23	Chất gắn kết PD1/ nhóm gắn kết	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSS

FIG.2-2

SEQ ID NO	Mô tả	Trình tự
24	Chất gắn kết PD1/ nhóm gắn kết	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSS
25	Tham chiếu A (89T) +A	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTSSA
26	Tham chiếu A (11V + 110K) +A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTATYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVKVSSA
27	Tham chiếu A (11V + 110Q) +A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVQVSSA
28	Tham chiếu A (11V + 112K) +A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVKSA
29	Tham chiếu A (11V + 112Q) +A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVQSA
30	Tham chiếu A (89L + 110K) +A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVKVSSA
31	Tham chiếu A (89L + 110Q) +A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVQVSSA
32	Tham chiếu A (89L + 112K) +A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVKSA
33	Tham chiếu A (89L + 112Q) +A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVQSA

FIG.2-3

SEQ ID NO	Mô tả	Trình tự
34	Tham chiếu A (11V + 89L) +A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSSA
35	Tham chiếu A (11V + 89L + 110K) +A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVKVSSA
36	Tham chiếu A (11V + 89L + 110Q) +A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVQVSSA
37	Tham chiếu A (11V + 89L + 112K) +A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVKSA
38	Tham chiếu A (11V + 89L + 112Q) +A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVQSA
39	Chất gắn kết PD1/ nhóm gắn kết	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSSA
40	Chất gắn kết PD1/ nhóm gắn kết	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTLVTVSSA

FIG.2-4

SEQ ID NO	Mô tả	Trình tự
41	Thẻ HIS6-FLAG3	HHHHHHGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAA
42	đầu tận cùng C	VTVKS
43	đầu tận cùng C	VTVQS
44	đầu tận cùng C	VKVSS
45	đầu tận cùng C	VQVSS
46	đầu tận cùng C	VTVKSX(n)
47	đầu tận cùng C	VTVQSX(n)
48	đầu tận cùng C	VKVSSX(n)
49	đầu tận cùng C	VQVSSX(n)
50	đầu tận cùng C	VTVKSA
51	đầu tận cùng C	VTVQSA
52	đầu tận cùng C	VKVSSA
53	đầu tận cùng C	VQVSSA
54	đầu tận cùng C	VTVSS
55	đầu tận cùng C	VTVSSX(n)
56	đầu tận cùng C	VTVSSA

FIG.2-5

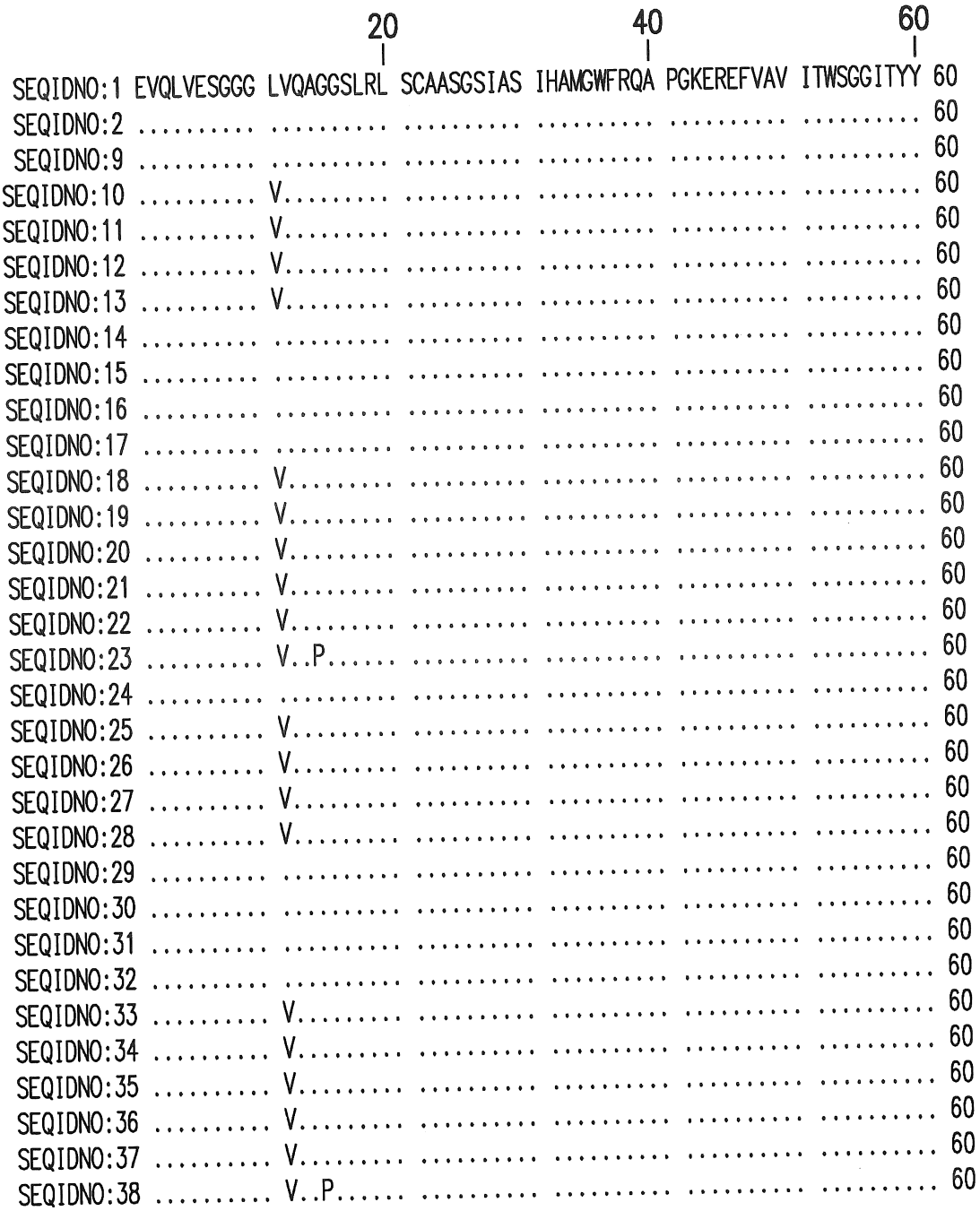

20
40
60
SEQIDNO:1 EVQLVESGGG LVQAGGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAV ITWSGGITYY 60
SEQIDNO:2 60
SEQIDNO:9 60
SEQIDNO:10 ..... V..... 60
SEQIDNO:11 ..... V..... 60
SEQIDNO:12 ..... V..... 60
SEQIDNO:13 ..... V..... 60
SEQIDNO:14 60
SEQIDNO:15 60
SEQIDNO:16 60
SEQIDNO:17 60
SEQIDNO:18 ..... V..... 60
SEQIDNO:19 ..... V..... 60
SEQIDNO:20 ..... V..... 60
SEQIDNO:21 ..... V..... 60
SEQIDNO:22 ..... V..... 60
SEQIDNO:23 ..... V..P..... 60
SEQIDNO:24 60
SEQIDNO:25 ..... V..... 60
SEQIDNO:26 ..... V..... 60
SEQIDNO:27 ..... V..... 60
SEQIDNO:28 ..... V..... 60
SEQIDNO:29 60
SEQIDNO:30 60
SEQIDNO:31 60
SEQIDNO:32 60
SEQIDNO:33 ..... V..... 60
SEQIDNO:34 ..... V..... 60
SEQIDNO:35 ..... V..... 60
SEQIDNO:36 ..... V..... 60
SEQIDNO:37 ..... V..... 60
SEQIDNO:38 ..... V..P..... 60

FIG.3A

```
                                  80                  100                 120
                                  |                   |                   |
SEQIDNO:1  ADSVKGRFTI SRDNAKNTVY LQMNSLKPED TAIYYCAGDK HQSSWYDYWG QGTQVTVSS- 119
SEQIDNO:2  .......... .......... .......... .......... .......... ...L.....- 119
SEQIDNO:9  .......... .......... .......... ..T....... .......... ...L.....- 119
SEQIDNO:10 .......... .......... .......... .......... .......... ...L.K...- 119
SEQIDNO:11 .......... .......... .......... .......... .......... ...L.Q...- 119
SEQIDNO:12 .......... .......... .......... .......... .......... ...L...K.- 119
SEQIDNO:13 .......... .......... .......... .......... .......... ...L...Q.- 119
SEQIDNO:14 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.K...- 119
SEQIDNO:15 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.Q...- 119
SEQIDNO:16 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L...K.- 119
SEQIDNO:17 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L...Q.- 119
SEQIDNO:18 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.....- 119
SEQIDNO:19 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.K...- 119
SEQIDNO:20 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.Q...- 119
SEQIDNO:21 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L...K.- 119
SEQIDNO:22 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L...Q.- 119
SEQIDNO:23 .......... ....S..... ......R... ..L....... .......... ...L.....- 119
SEQIDNO:24 .......... .......... .......... ..T....... .......... ...L.....A 120
SEQIDNO:25 .......... .......... .......... .......... .......... ...L.K...A 120
SEQIDNO:26 .......... .......... .......... .......... .......... ...L.Q...A 120
SEQIDNO:27 .......... .......... .......... .......... .......... ...L...K.A 120
SEQIDNO:28 .......... .......... .......... .......... .......... ...L...Q.A 120
SEQIDNO:29 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.K...A 120
SEQIDNO:30 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.Q...A 120
SEQIDNO:31 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L...K.A 120
SEQIDNO:32 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L...Q.A 120
SEQIDNO:33 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.....A 120
SEQIDNO:34 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.K...A 120
SEQIDNO:35 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L.Q...A 120
SEQIDNO:36 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L...K.A 120
SEQIDNO:37 .......... .......... .......... ..V....... .......... ...L...Q.A 120
SEQIDNO:38 .......... ....S..... ......R... ..L....... .......... ...L.....A 120
```

FIG.3B

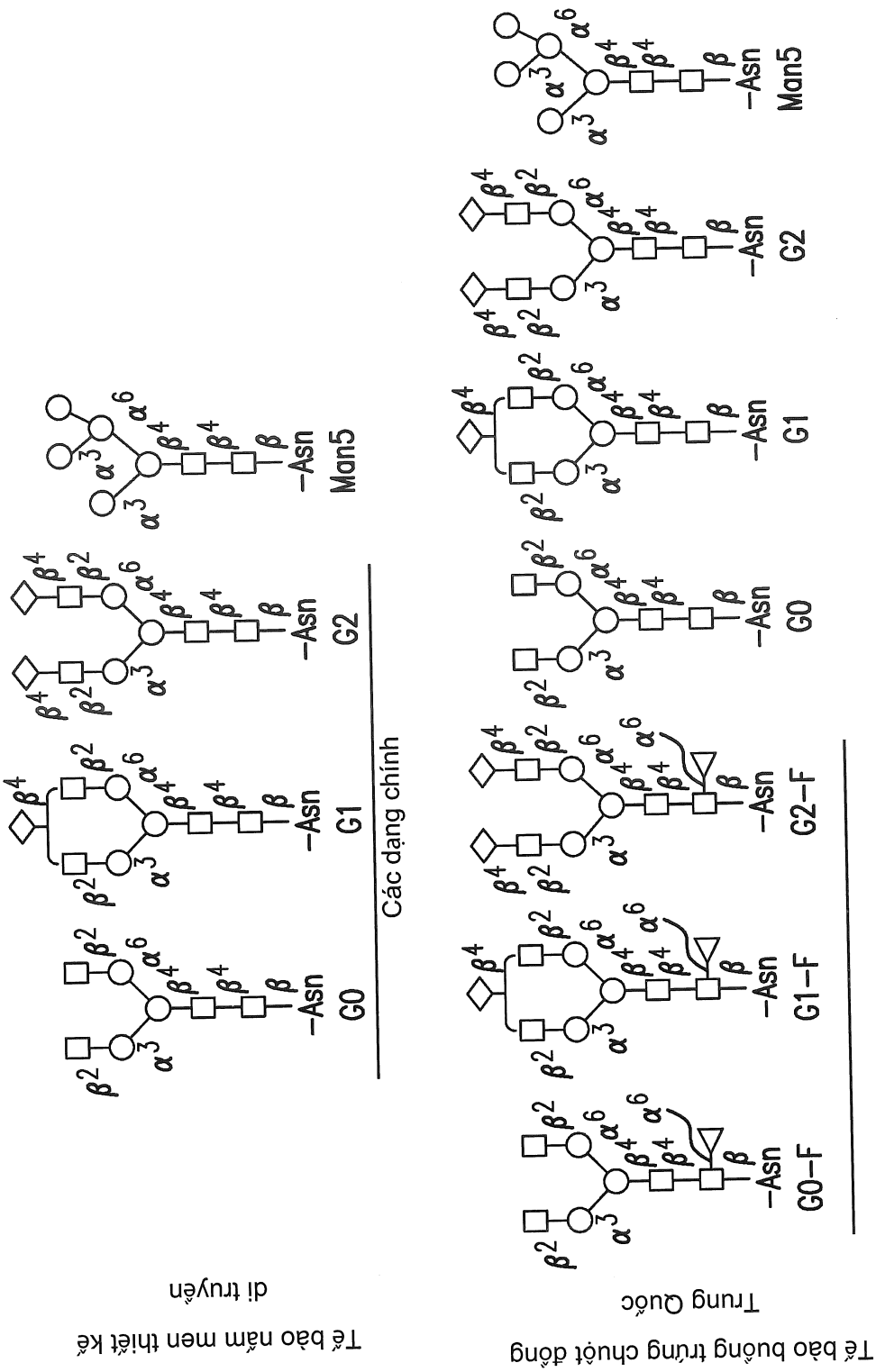

Tế bào nấm men thiết kế
di truyền
Các dạng chính
G0
G1
G2
Man5
Tế bào buồng trứng chuột đồng
Trung Quốc
G0−F
G1−F
G2−F
G0
G1
G2
Man5
−Asn

FIG.4

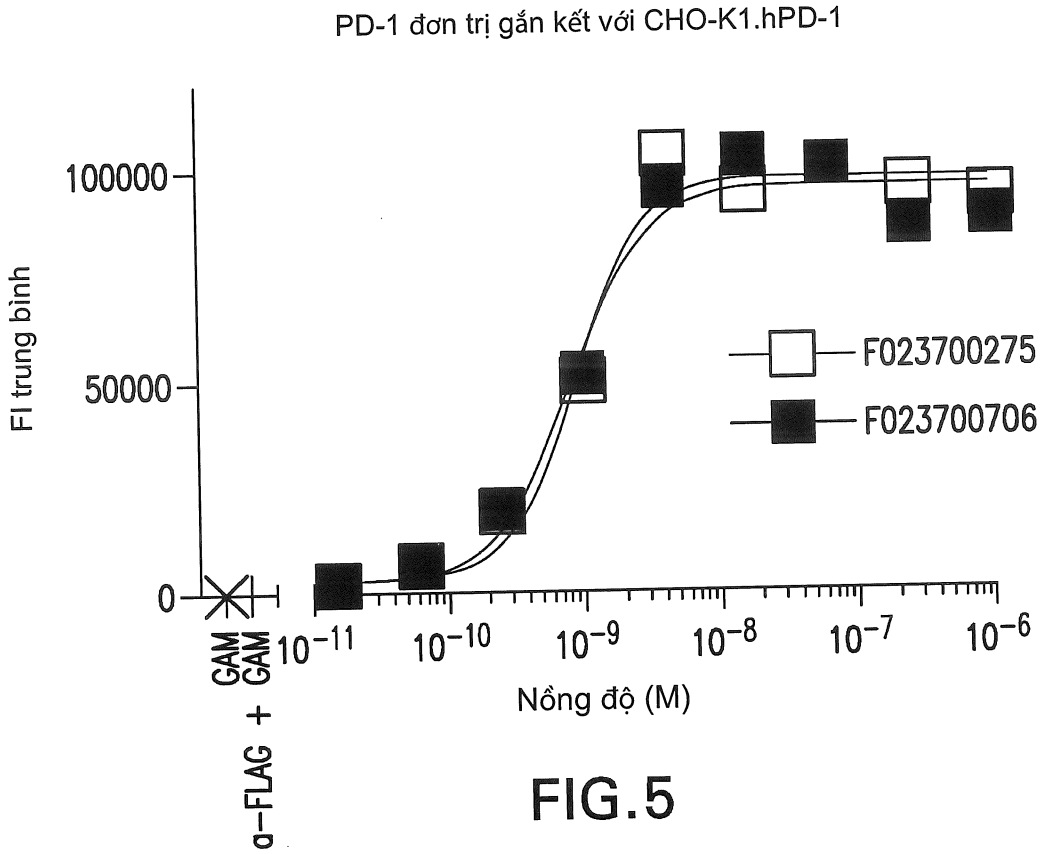


FIG.5

F023700275: 1PD102C12(A14P,A74S,K83R)–FLAG3–HIS6
F023700706: 1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)–FLAG3–HIS6

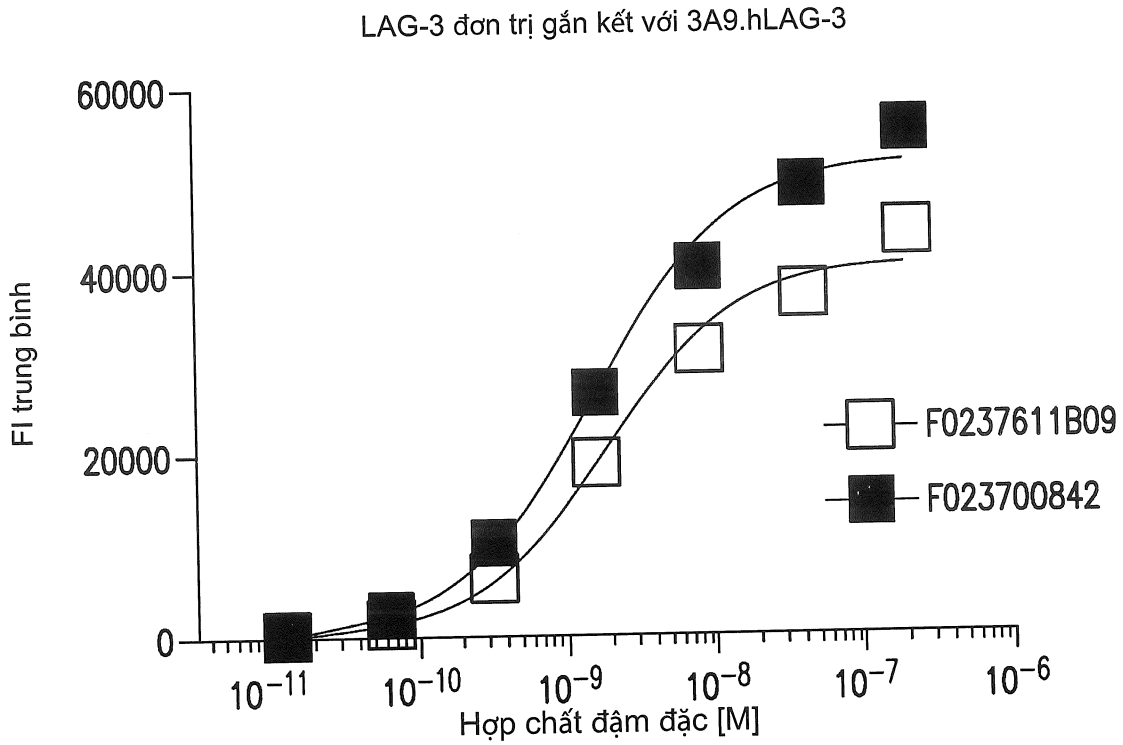


FIG.6

F0237611B09–*FLAG3–HIS6*
F023700842: F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)–FLAG3–HIS6

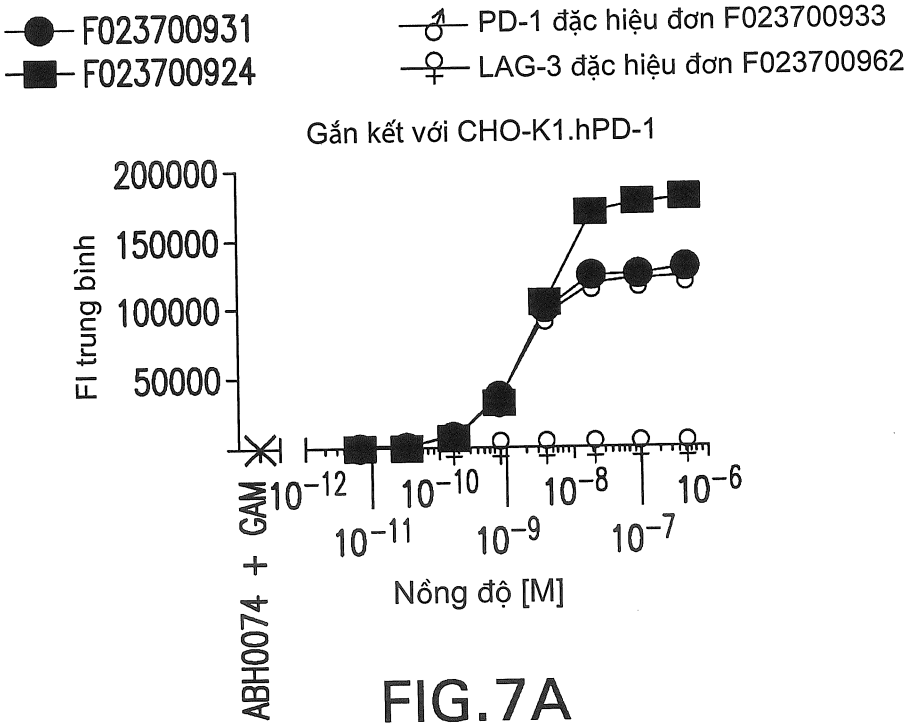

F023700931
F023700924
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG-3 đặc hiệu đơn F023700962
Gắn kết với CHO-K1.hPD-1
FI trung bình
200000
150000
100000
50000
ABH0074 + GAM
10−12
10−11
10−10
10−9
10−8
10−7
10−6
Nồng độ [M]

FIG.7A

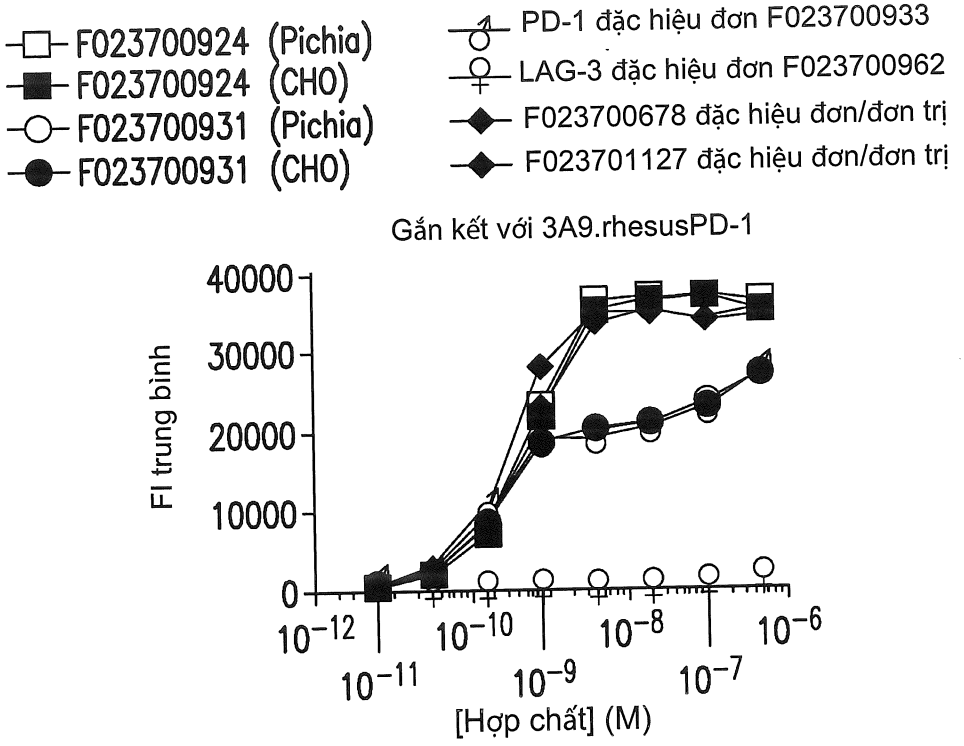

F023700924 (Pichia)
F023700924 (CHO)
F023700931 (Pichia)
F023700931 (CHO)
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG-3 đặc hiệu đơn F023700962
F023700678 đặc hiệu đơn/đơn trị
F023701127 đặc hiệu đơn/đơn trị
Gắn kết với 3A9.rhesusPD-1
FI trung bình
40000
30000
20000
10000
0
10−12
10−11
10−10
10−9
10−8
10−7
10−6
[Hợp chất] (M)

FIG.7B

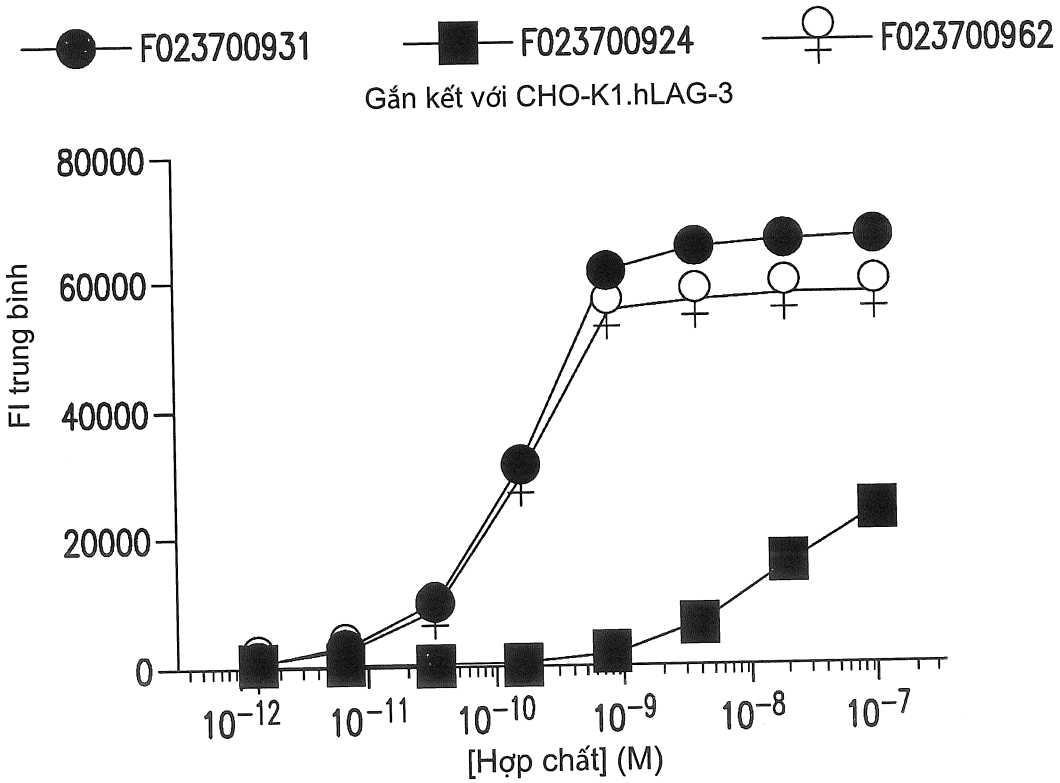

F023700931
F023700924
F023700962
Gắn kết với CHO-K1.hLAG-3
80000
60000
40000
20000
0
FI trung bình
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
[Hợp chất] (M)

FIG.8A

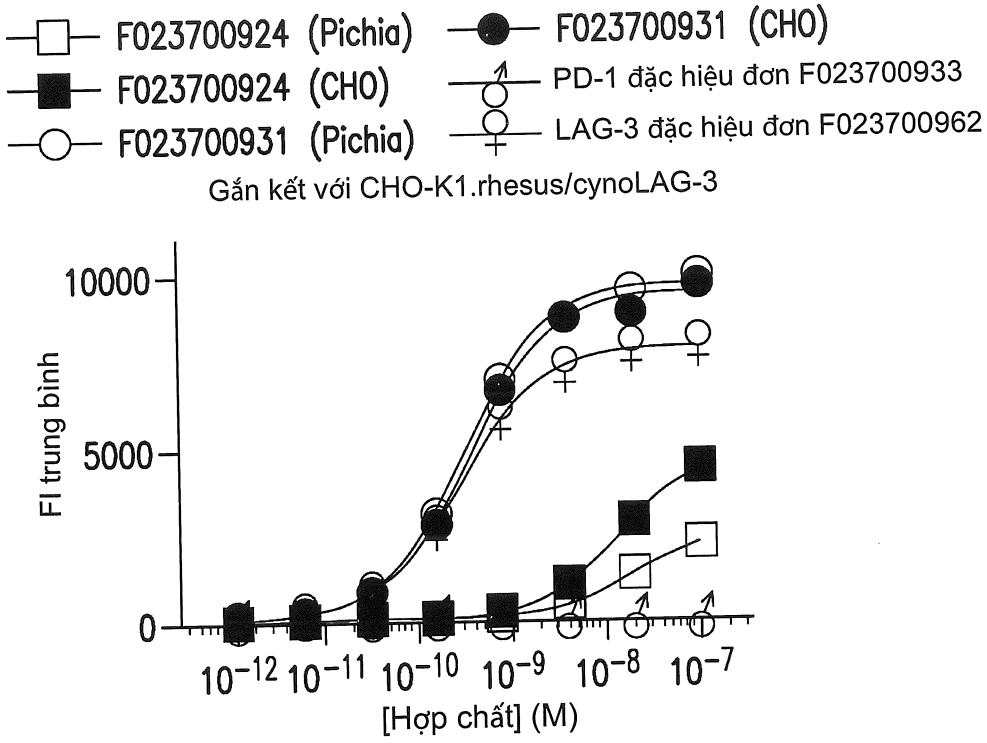

F023700924 (Pichia)
F023700924 (CHO)
F023700931 (Pichia)
F023700931 (CHO)
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG-3 đặc hiệu đơn F023700962
Gắn kết với CHO-K1.rhesus/cynoLAG-3
10000
5000
0
FI trung bình
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
[Hợp chất] (M)

FIG.8B

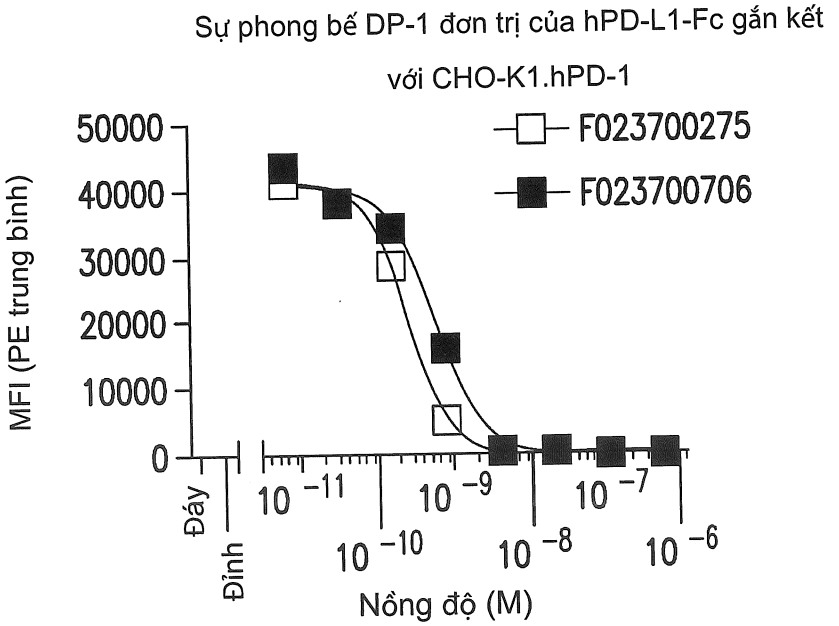

Sự phong bế DP-1 đơn trị của hPD-L1-Fc gắn kết với CHO-K1.hPD-1
F023700275
F023700706
MFI (PE trung bình)
50000
40000
30000
20000
10000
0
Đáy
Đỉnh
10 -11
10 -10
10 -9
10 -8
10 -7
10 -6
Nồng độ (M)

FIG.9A

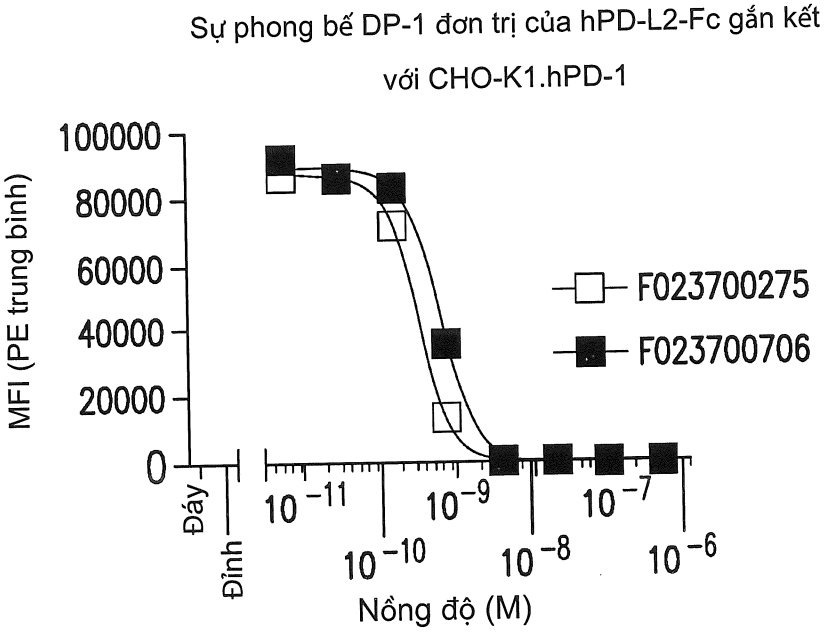

Sự phong bế DP-1 đơn trị của hPD-L2-Fc gắn kết với CHO-K1.hPD-1
F023700275
F023700706
MFI (PE trung bình)
100000
80000
60000
40000
20000
0
Đáy
Đỉnh
10 -11
10 -10
10 -9
10 -8
10 -7
10 -6
Nồng độ (M)

FIG.9B

15/66

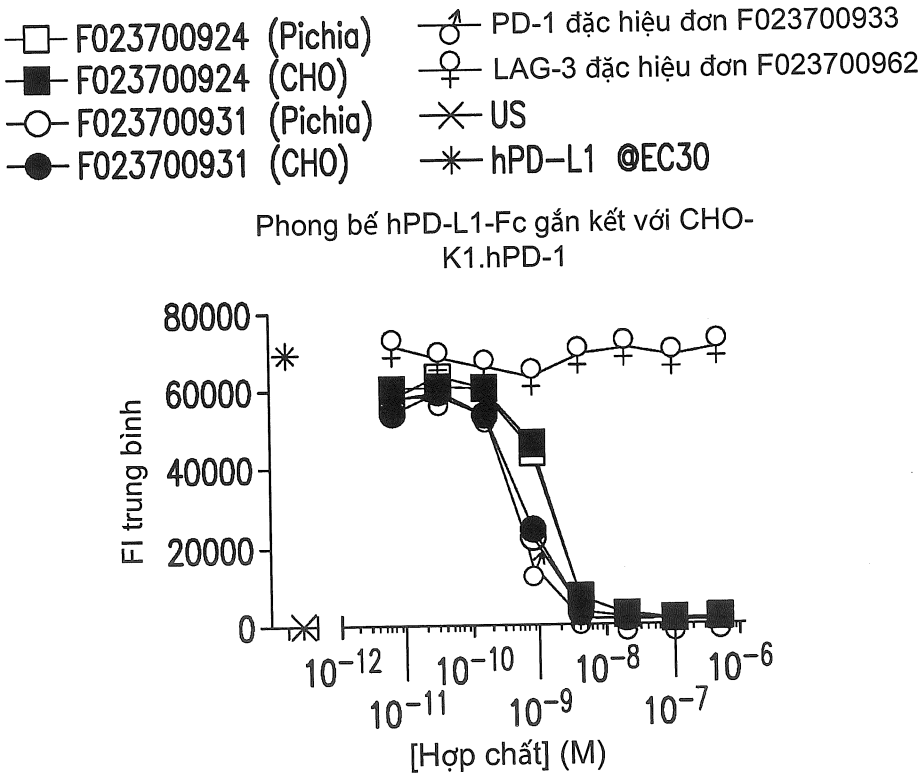


FIG.9C

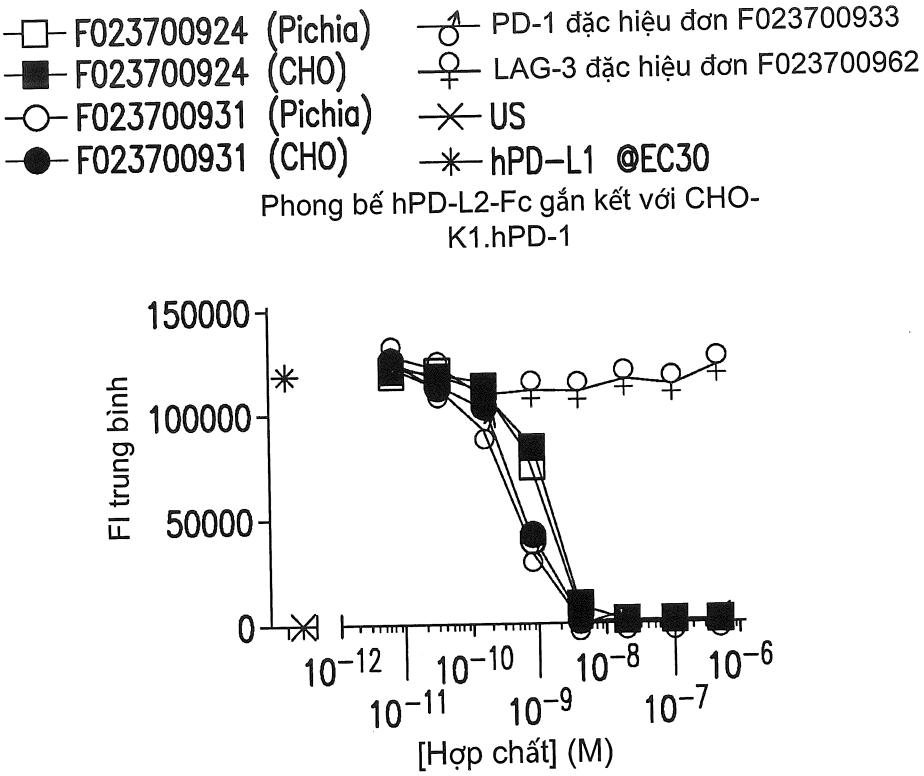


FIG.9D

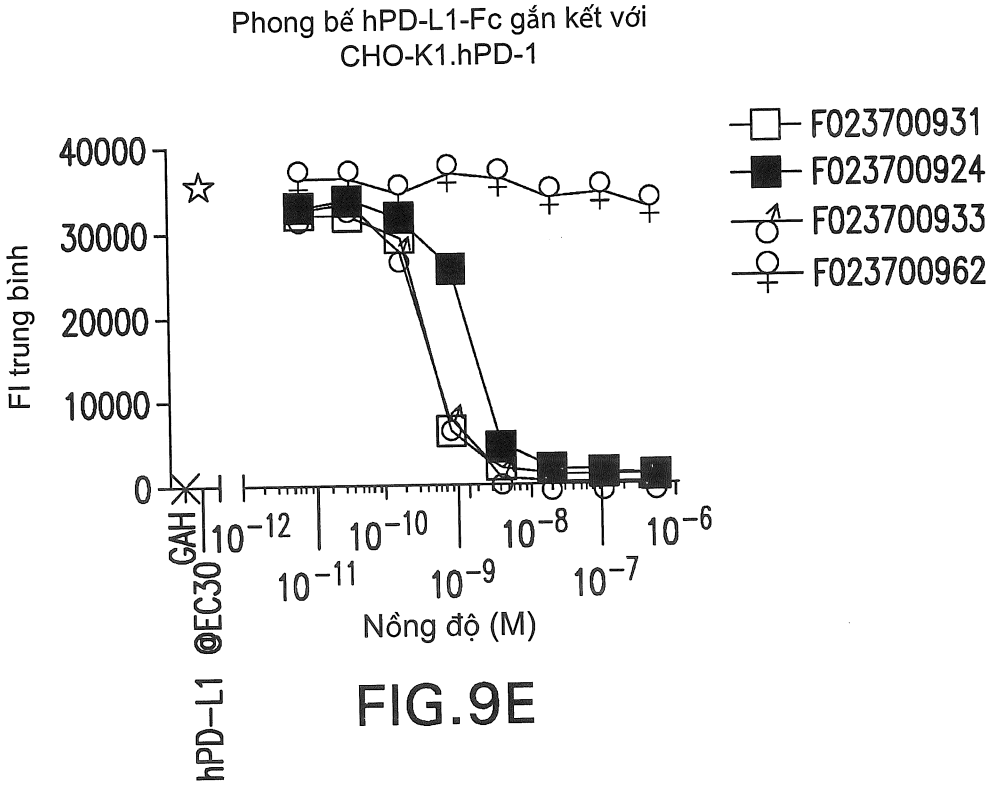

Phong bế hPD-L1-Fc gắn kết với
CHO-K1.hPD-1
F023700931
F023700924
F023700933
F023700962
40000
30000
20000
10000
0
FI trung bình
GAH
hPD-L1 @EC30
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
Nồng độ (M)

FIG.9E

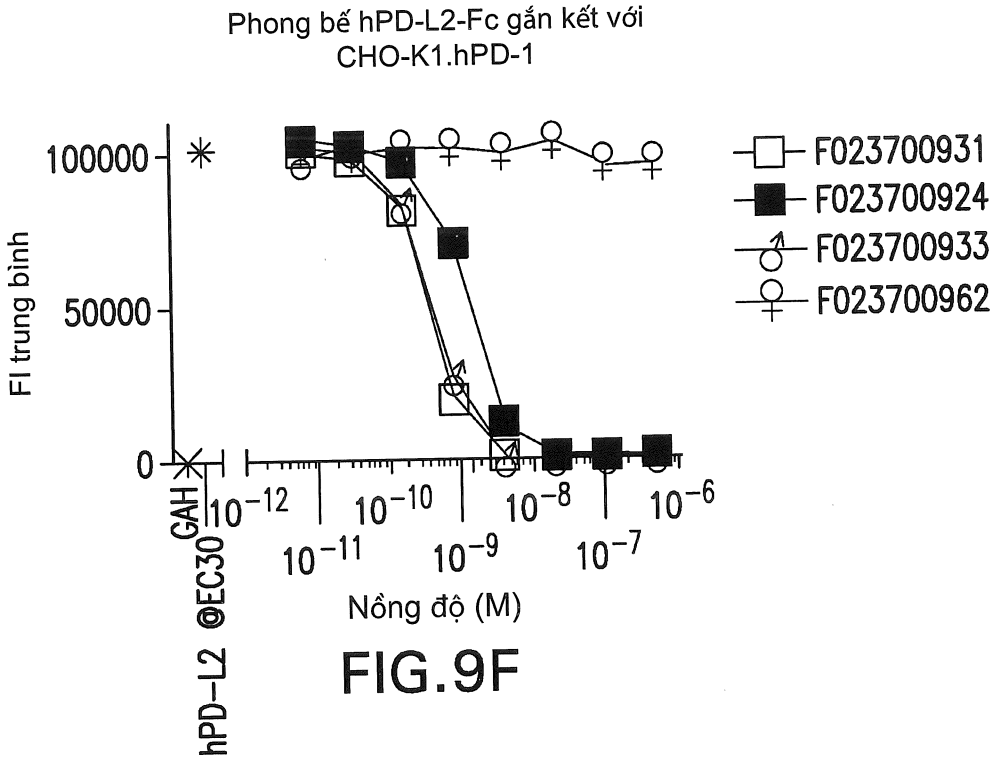

Phong bế hPD-L2-Fc gắn kết với
CHO-K1.hPD-1
F023700931
F023700924
F023700933
F023700962
100000
50000
0
FI trung bình
GAH
hPD-L2 @EC30
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
Nồng độ (M)

FIG.9F

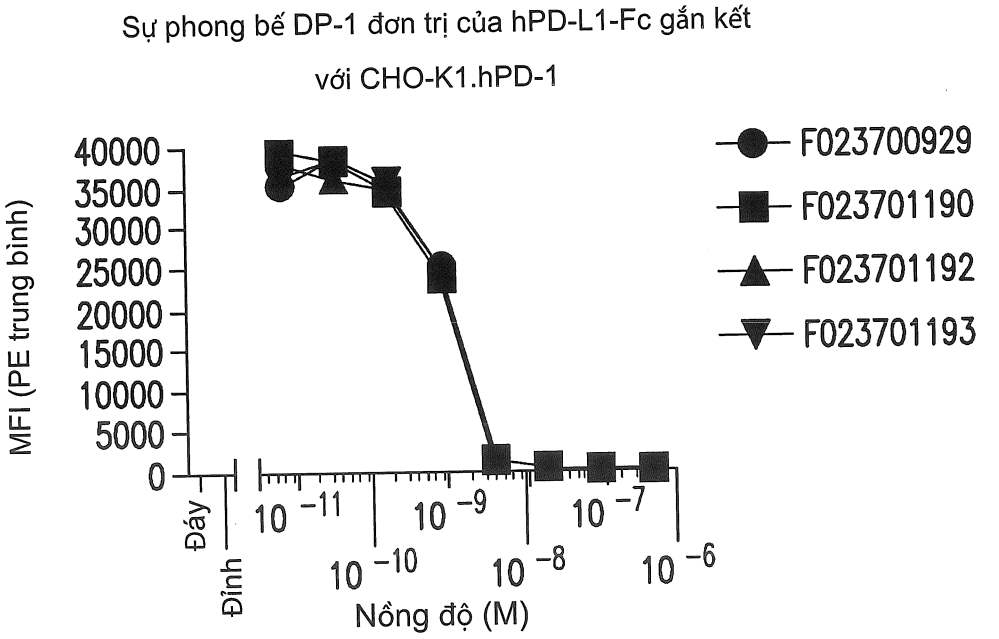

Sự phong bế DP-1 đơn trị của hPD-L1-Fc gắn kết
với CHO-K1.hPD-1
MFI (PE trung bình)
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Đáy
Đỉnh
10 −11
10 −10
10 −9
10 −8
10 −7
10 −6
Nồng độ (M)
F023700929
F023701190
F023701192
F023701193

FIG.9G

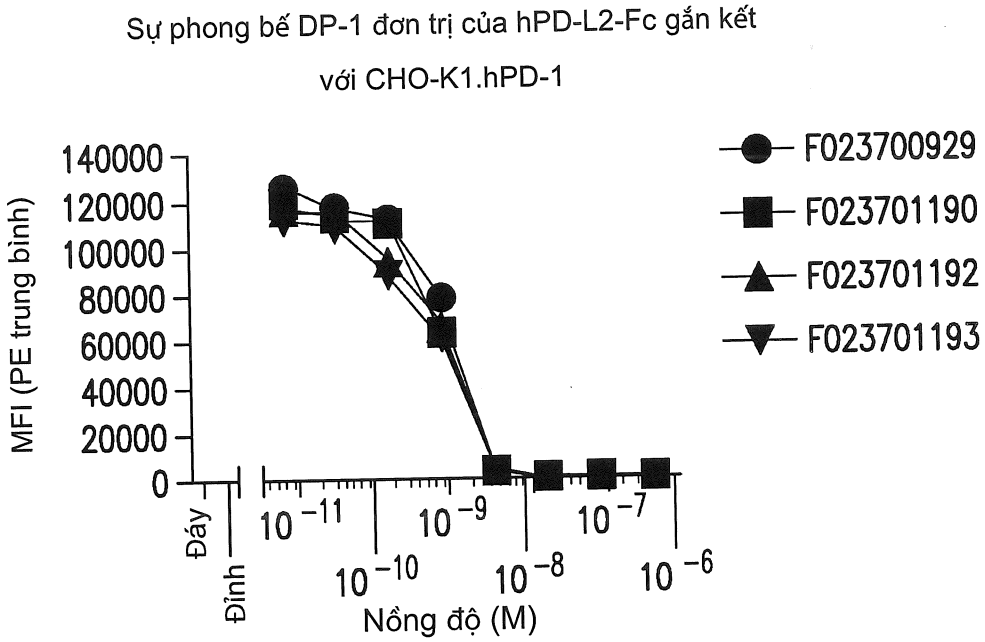

Sự phong bế DP-1 đơn trị của hPD-L2-Fc gắn kết
với CHO-K1.hPD-1
MFI (PE trung bình)
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Đáy
Đỉnh
10 −11
10 −10
10 −9
10 −8
10 −7
10 −6
Nồng độ (M)
F023700929
F023701190
F023701192
F023701193

FIG.9H

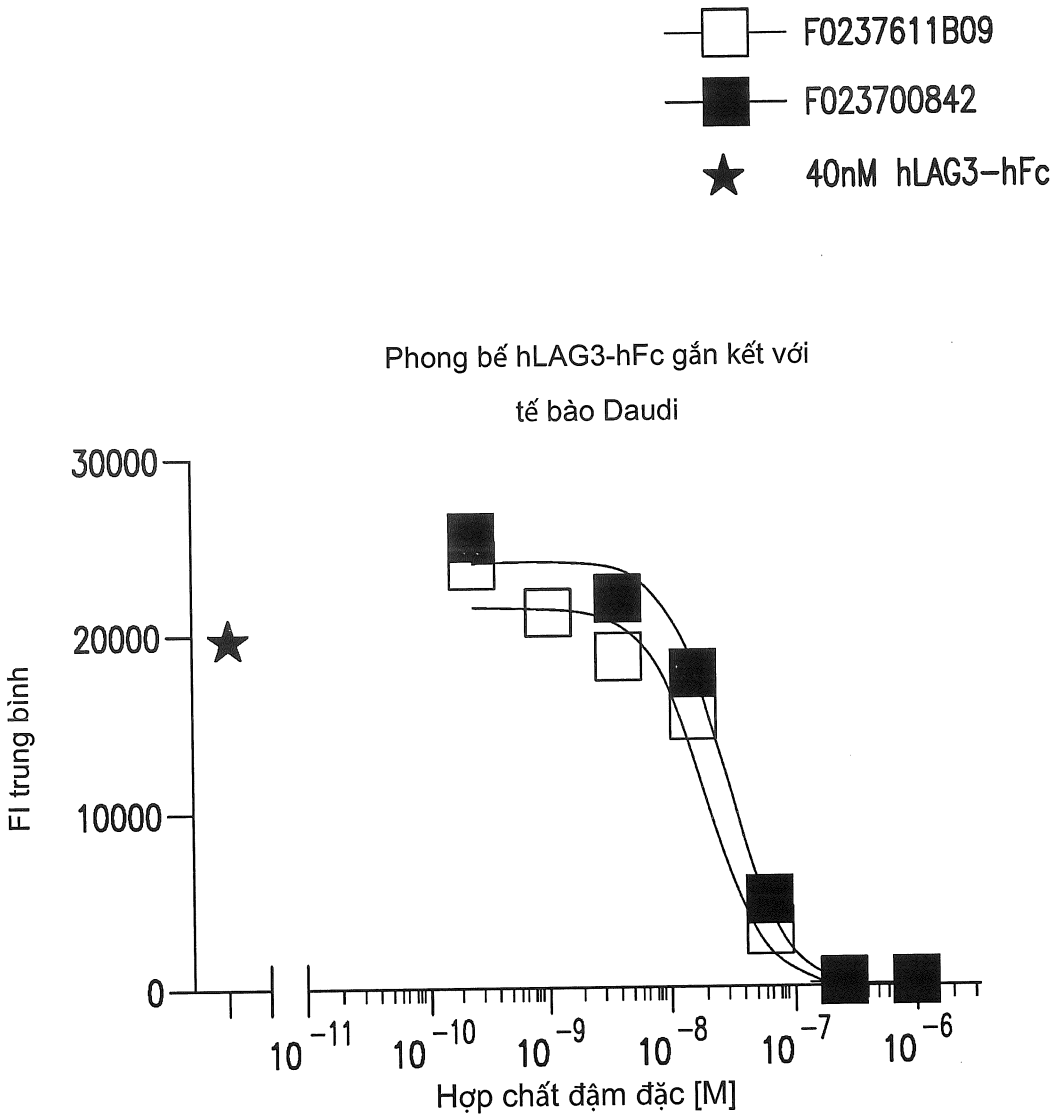


FIG.10A

F0237611B09–*FLAG3–HIS6*
F023700842: F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)–FLAG3–HIS6

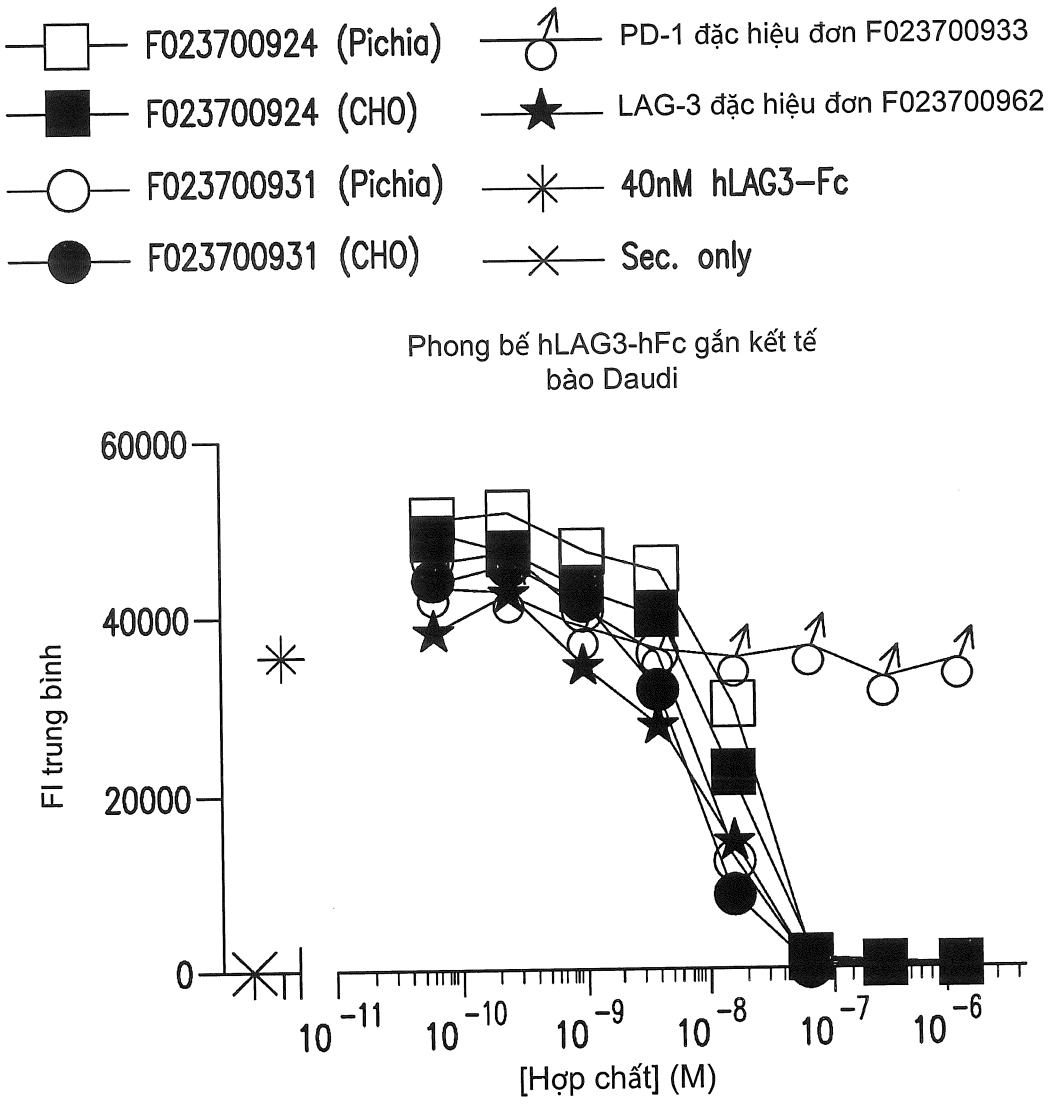

F023700924 (Pichia)
F023700924 (CHO)
F023700931 (Pichia)
F023700931 (CHO)
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG-3 đặc hiệu đơn F023700962
40nM hLAG3-Fc
Sec. only
Phong bế hLAG3-hFc gắn kết tế bào Daudi
FI trung bình
60000
40000
20000
0
10 -11
10 -10
10 -9
10 -8
10 -7
10 -6
[Hợp chất] (M)

FIG.10B

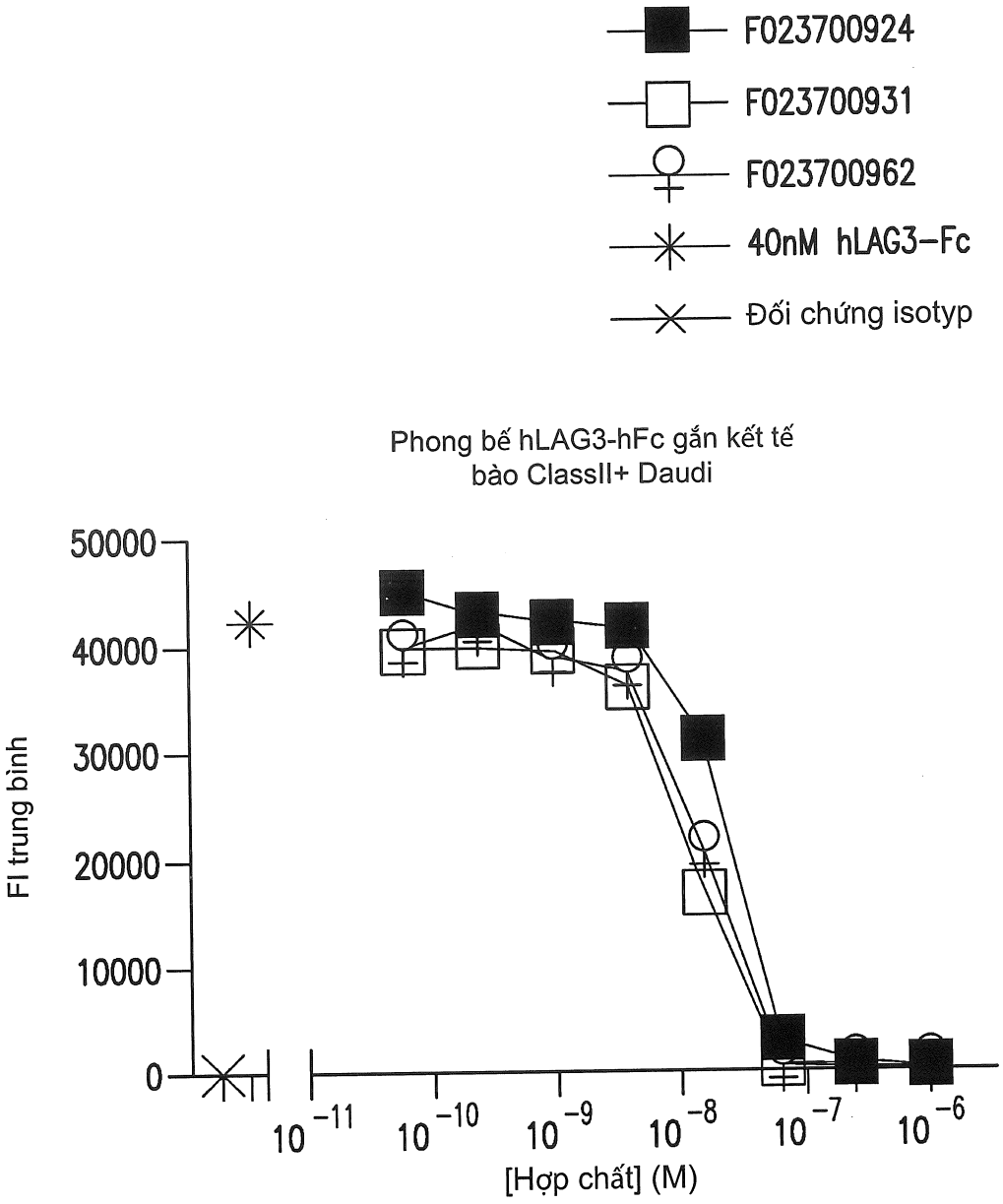

F023700924
F023700931
F023700962
40nM hLAG3-Fc
Đối chứng isotyp
Phong bế hLAG3-hFc gắn kết tế bào ClassII+ Daudi
FI trung bình
50000
40000
30000
20000
10000
0
10 -11
10 -10
10 -9
10 -8
10 -7
10 -6
[Hợp chất] (M)

FIG.10C

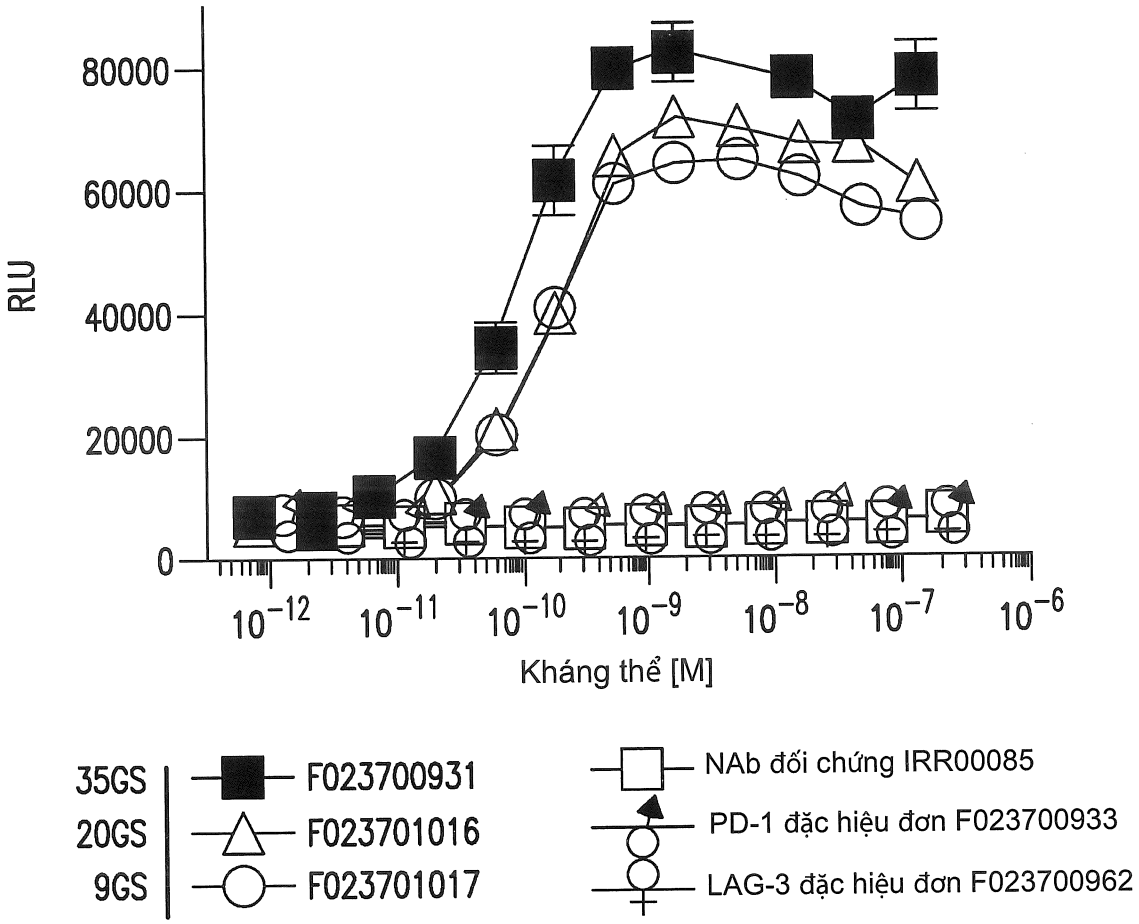

80000
60000
40000
20000
0
RLU
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
Kháng thể [M]
35GS
20GS
9GS
F023700931
F023701016
F023701017
NAb đối chứng IRR00085
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG-3 đặc hiệu đơn F023700962

FIG.11A

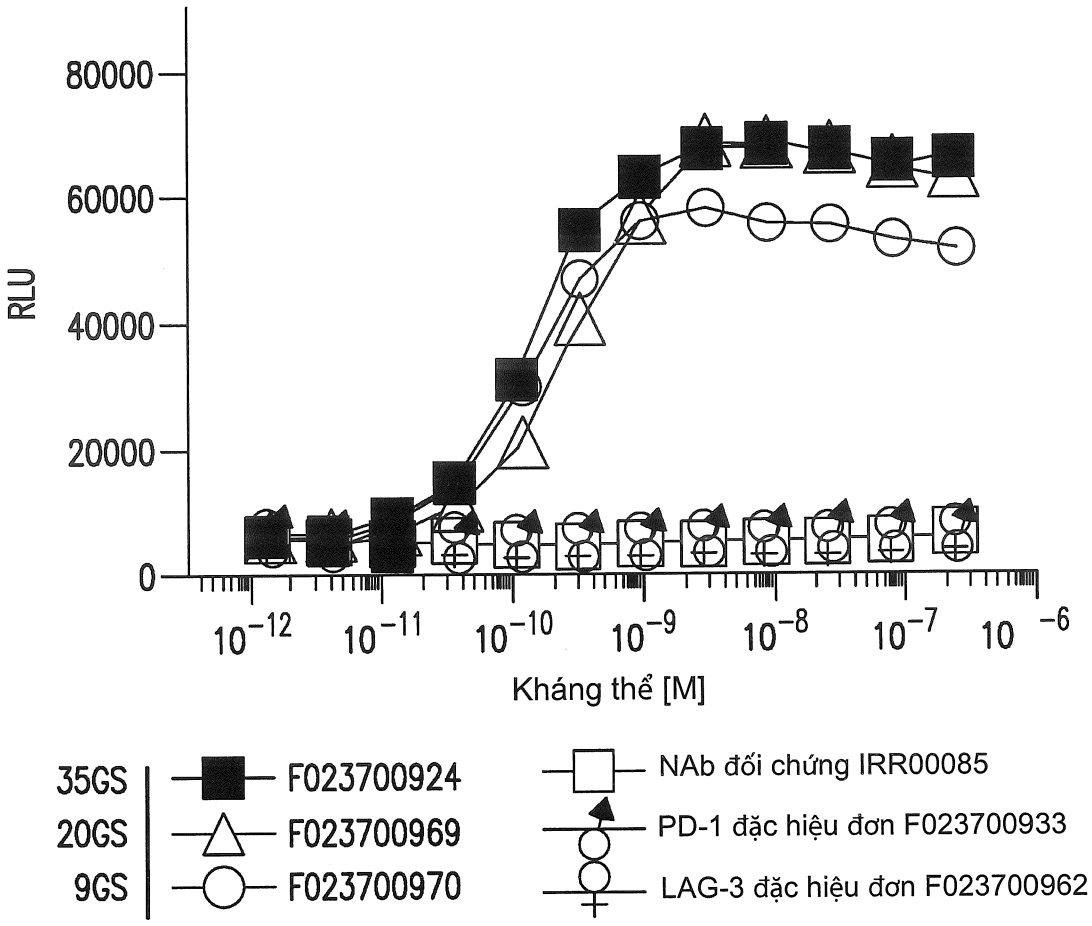

80000
60000
40000
20000
0
RLU
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
Kháng thể [M]
35GS
20GS
9GS
F023700924
F023700969
F023700970
NAb đối chứng IRR00085
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG-3 đặc hiệu đơn F023700962

FIG.11B

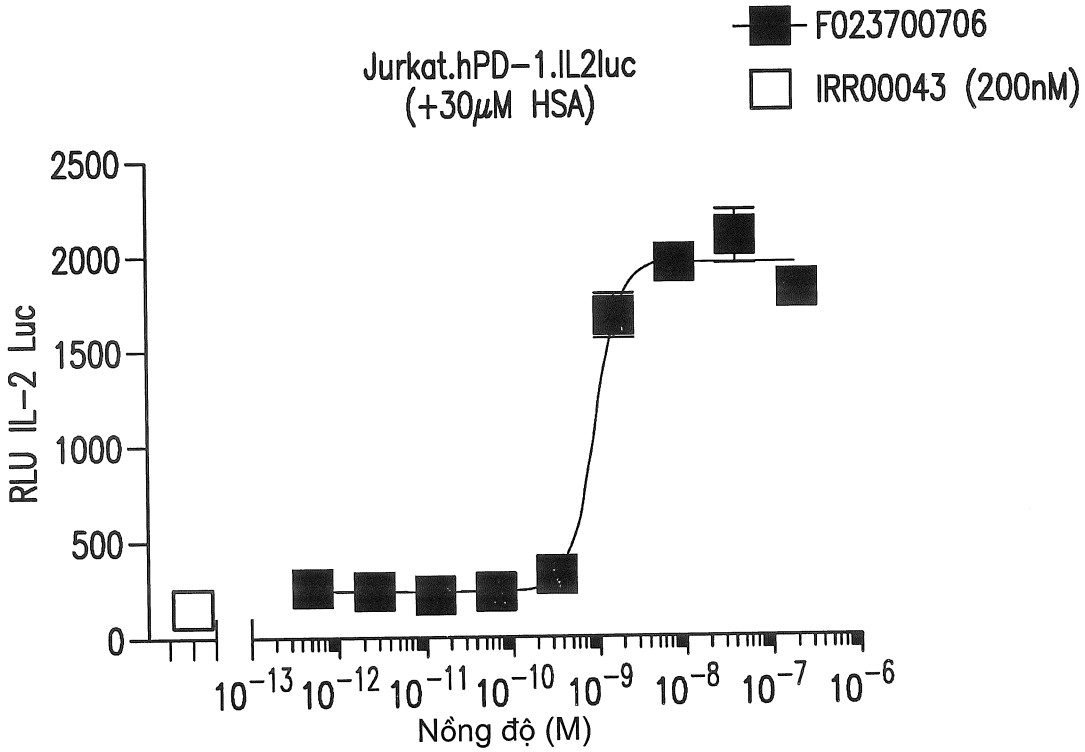


FIG.12A

F023700706: 1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6

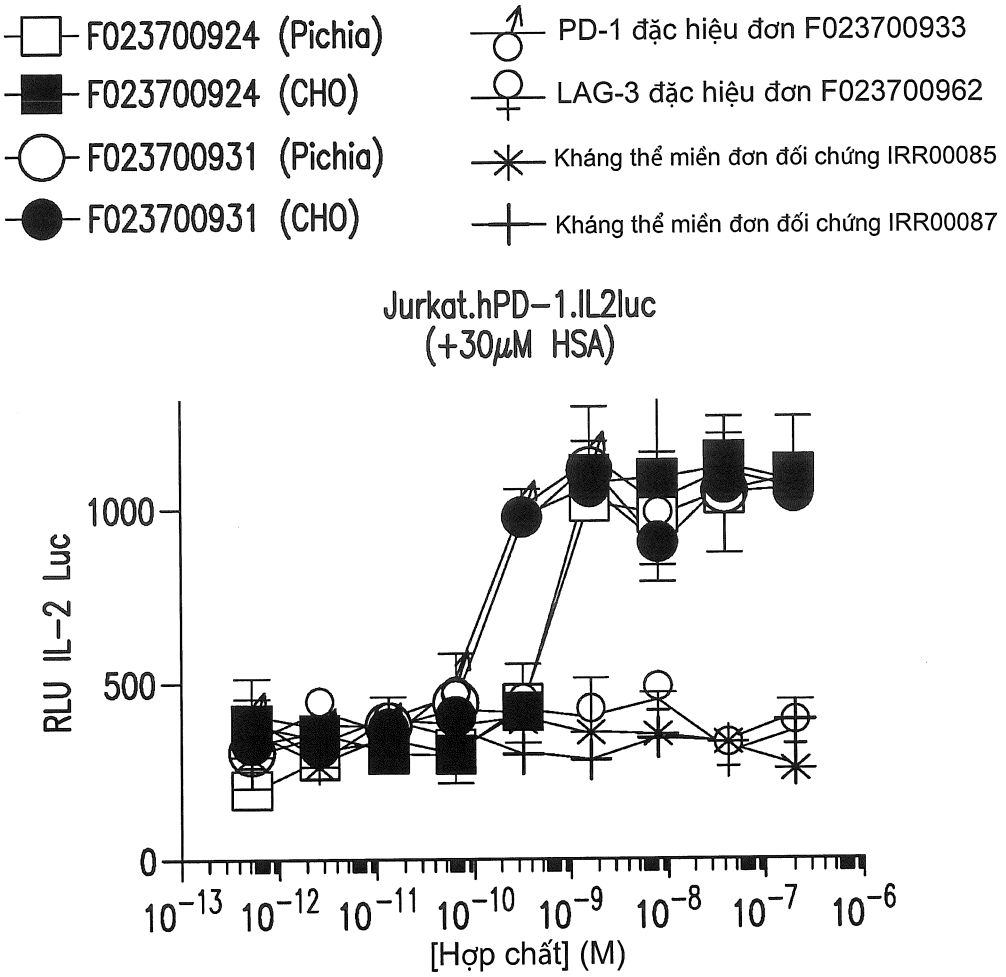

F023700924 (Pichia)
F023700924 (CHO)
F023700931 (Pichia)
F023700931 (CHO)
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG-3 đặc hiệu đơn F023700962
Kháng thể miễn đơn đối chứng IRR00085
Kháng thể miễn đơn đối chứng IRR00087
Jurkat.hPD-1.IL2luc
(+30μM HSA)
RLU IL-2 Luc
1000
500
0
10^-13 10^-12 10^-11 10^-10 10^-9 10^-8 10^-7 10^-6
[Hợp chất] (M)

FIG.12B

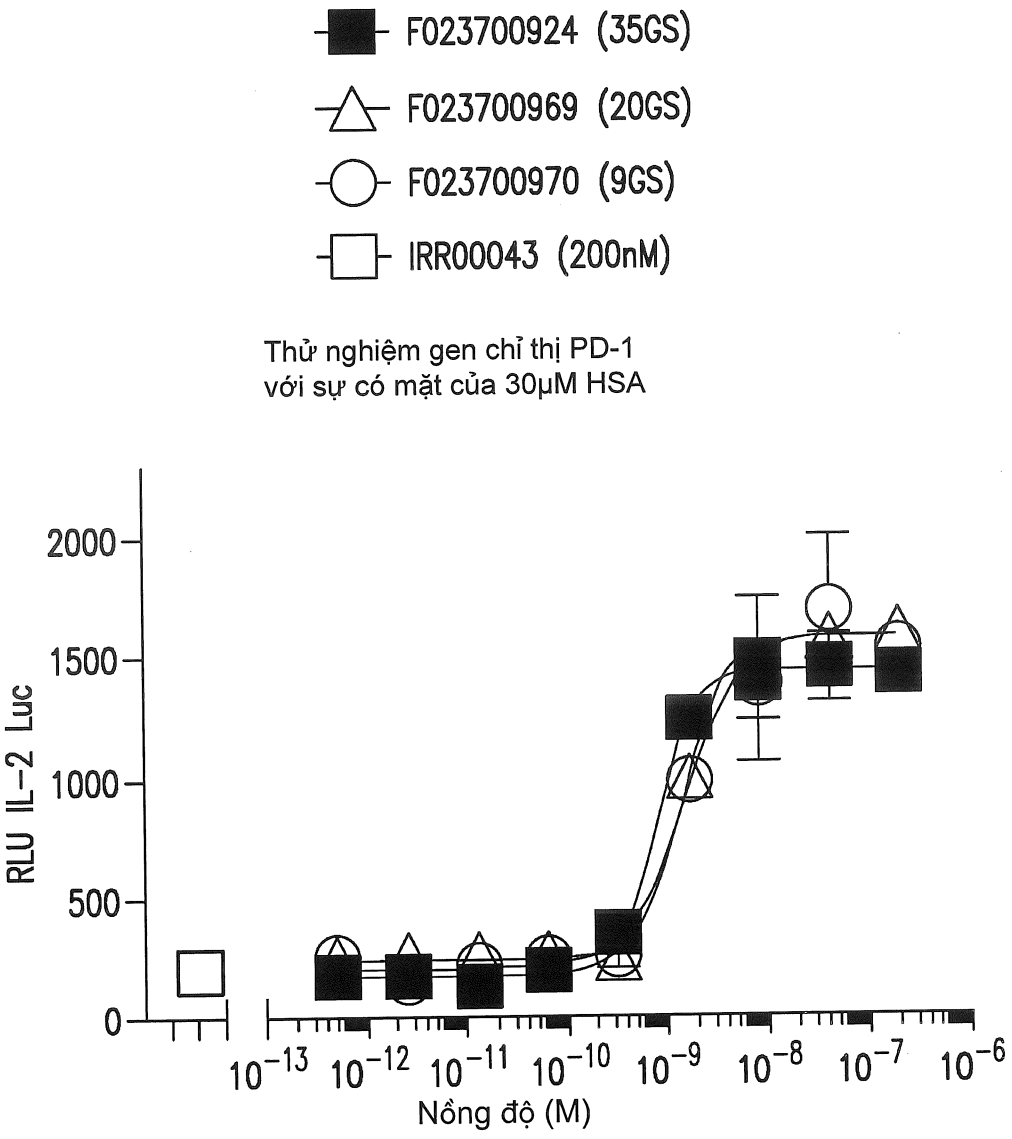

F023700924 (35GS)
F023700969 (20GS)
F023700970 (9GS)
IRR00043 (200nM)
Thử nghiệm gen chỉ thị PD-1
với sự có mặt của 30μM HSA
RLU IL-2 Luc
2000
1500
1000
500
0
10−13
10−12
10−11
10−10
10−9
10−8
10−7
10−6
Nồng độ (M)

FIG.12C

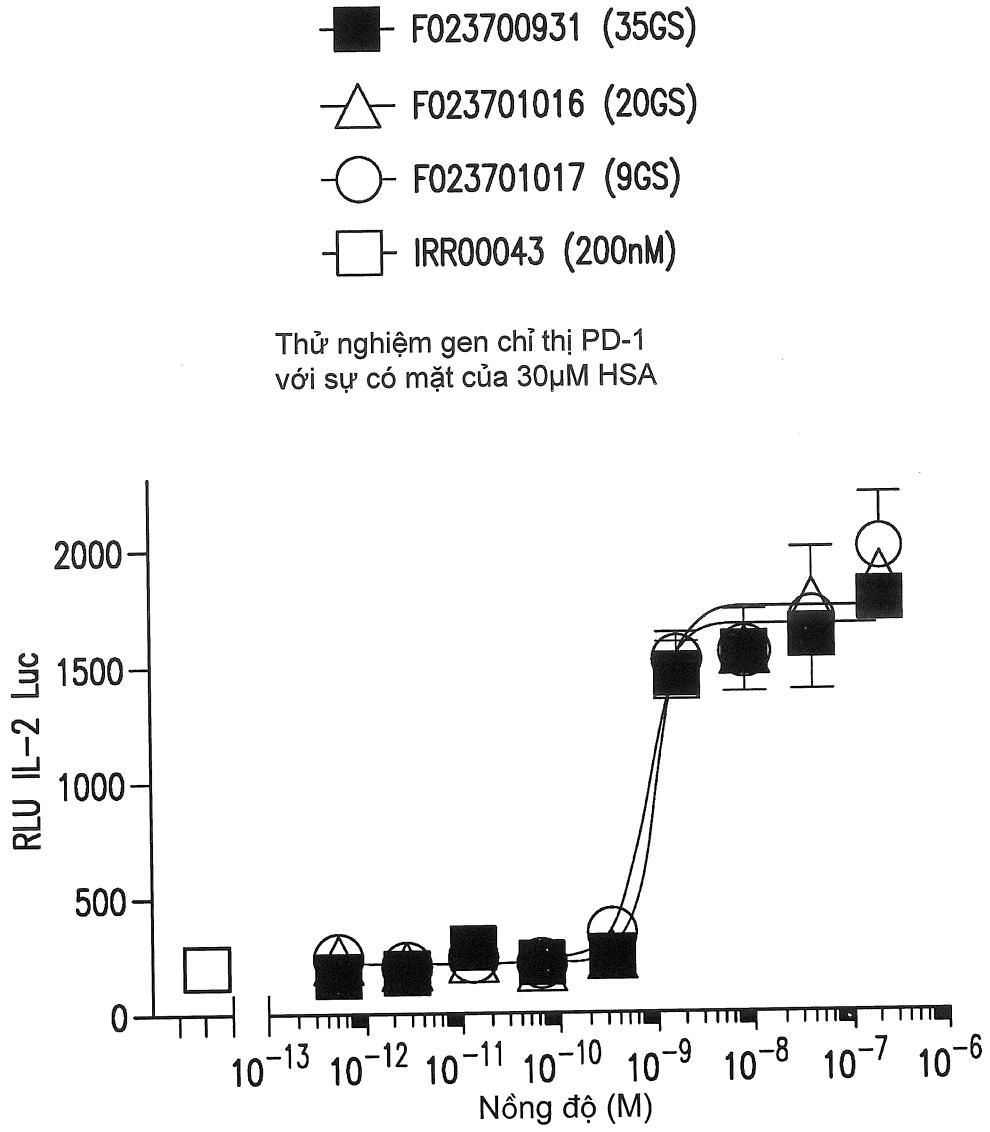

F023700931 (35GS)
F023701016 (20GS)
F023701017 (9GS)
IRR00043 (200nM)
Thử nghiệm gen chỉ thị PD-1
với sự có mặt của 30μM HSA
RLU IL-2 Luc
2000
1500
1000
500
0
10^{-13} 10^{-12} 10^{-11} 10^{-10} 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6}
Nồng độ (M)

FIG.12D

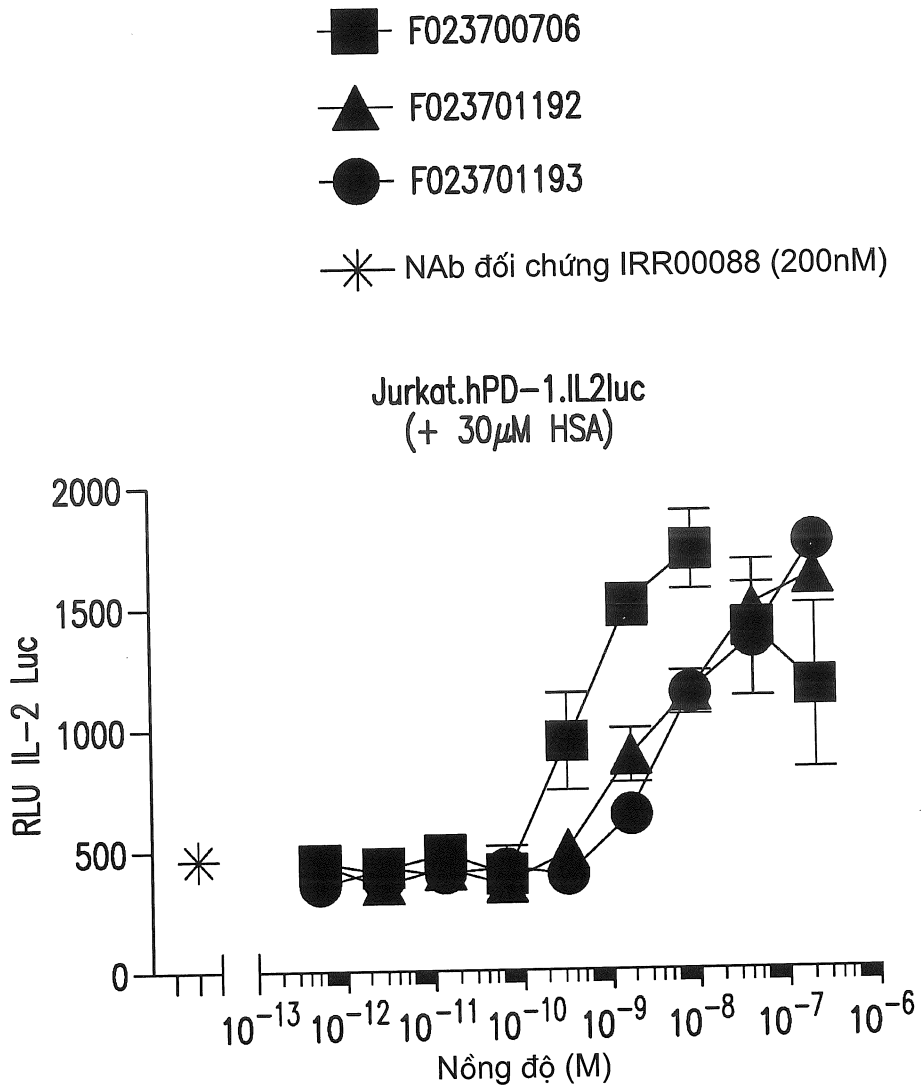


FIG.12E

F023700706: 1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6
F023701192: 1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6
F023701193: 1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6

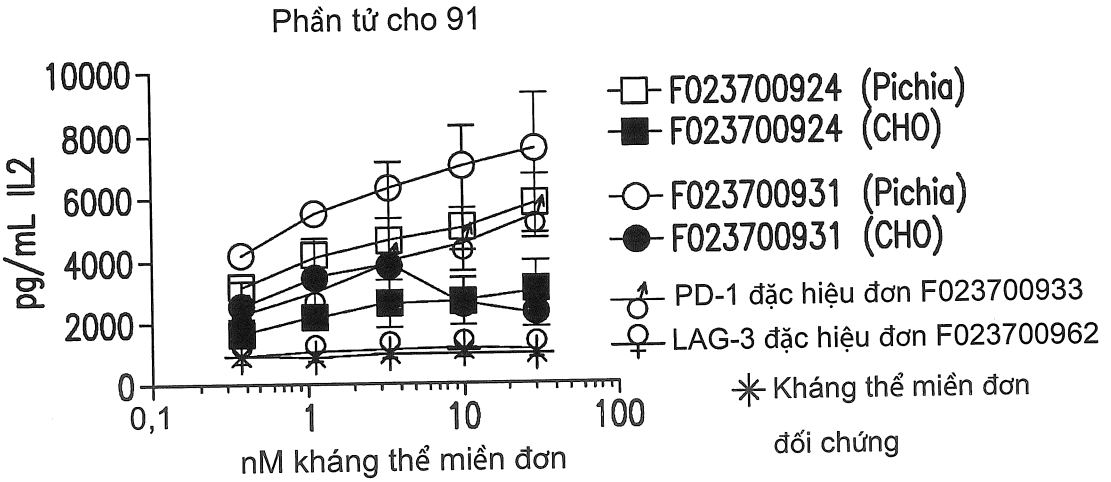


FIG.13A

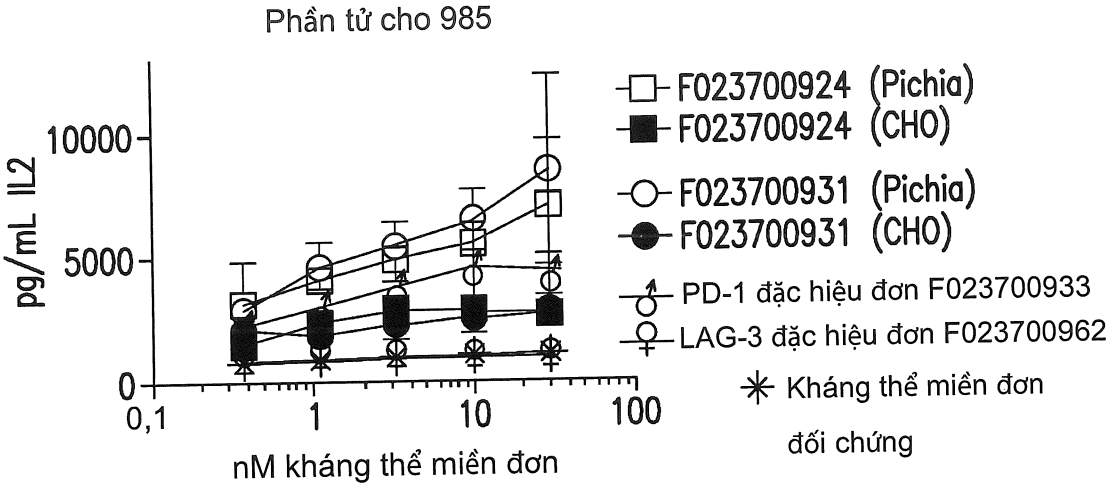


FIG.13B

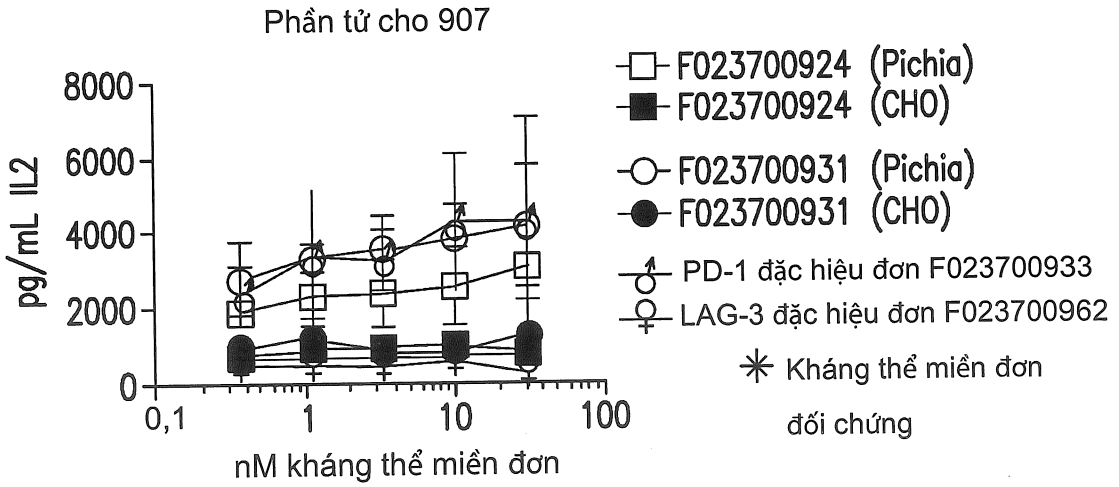


FIG.13C

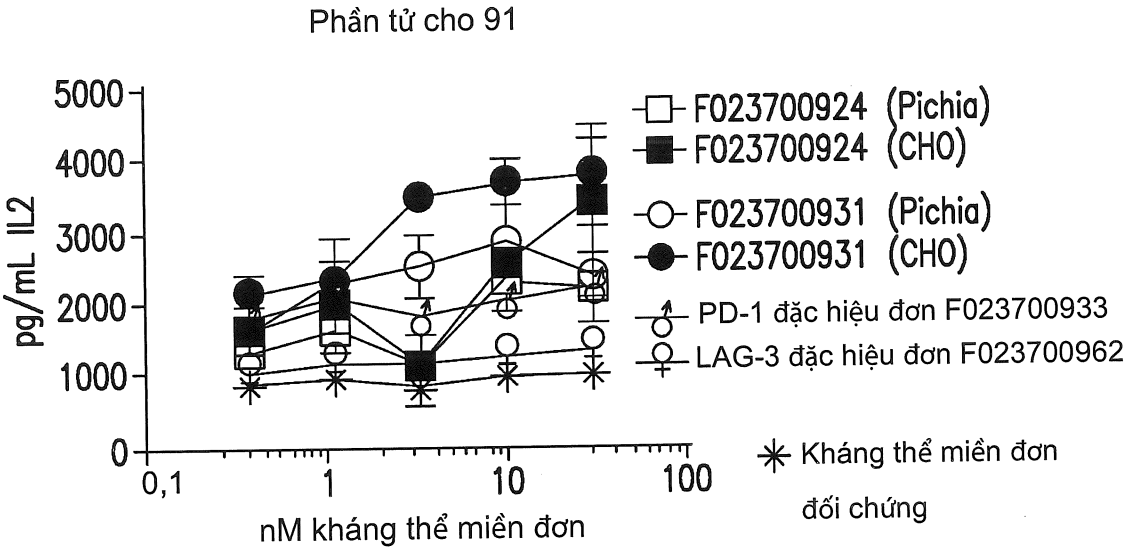


FIG.13D

30/66

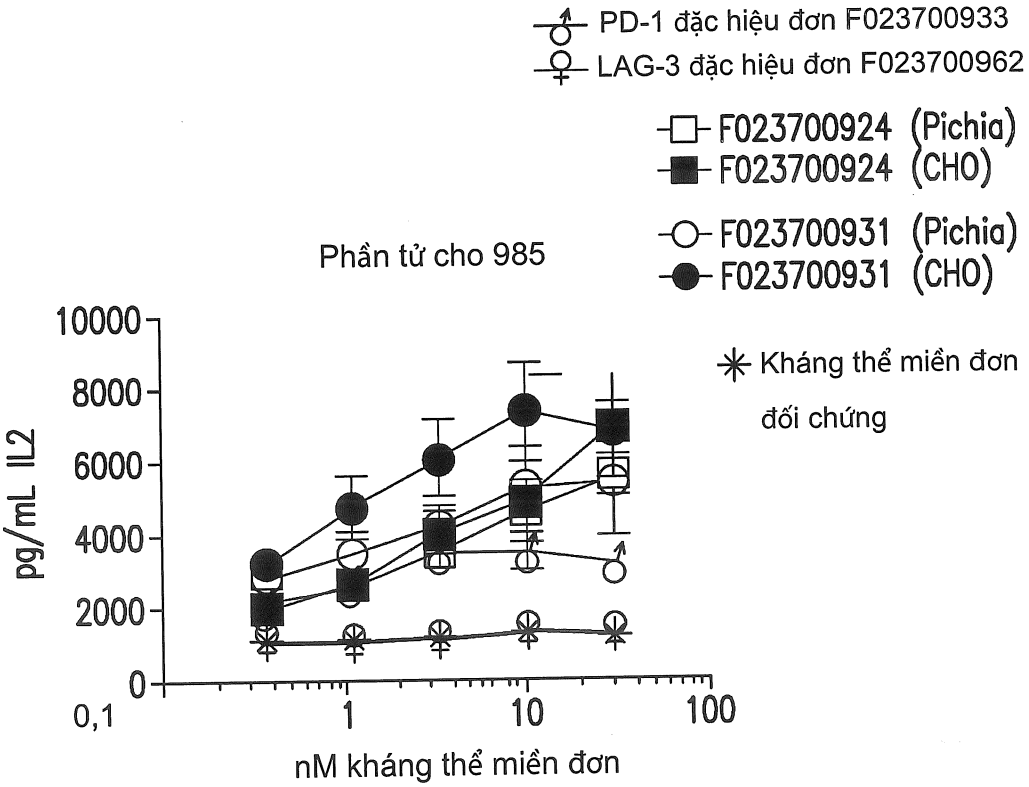


FIG.13E

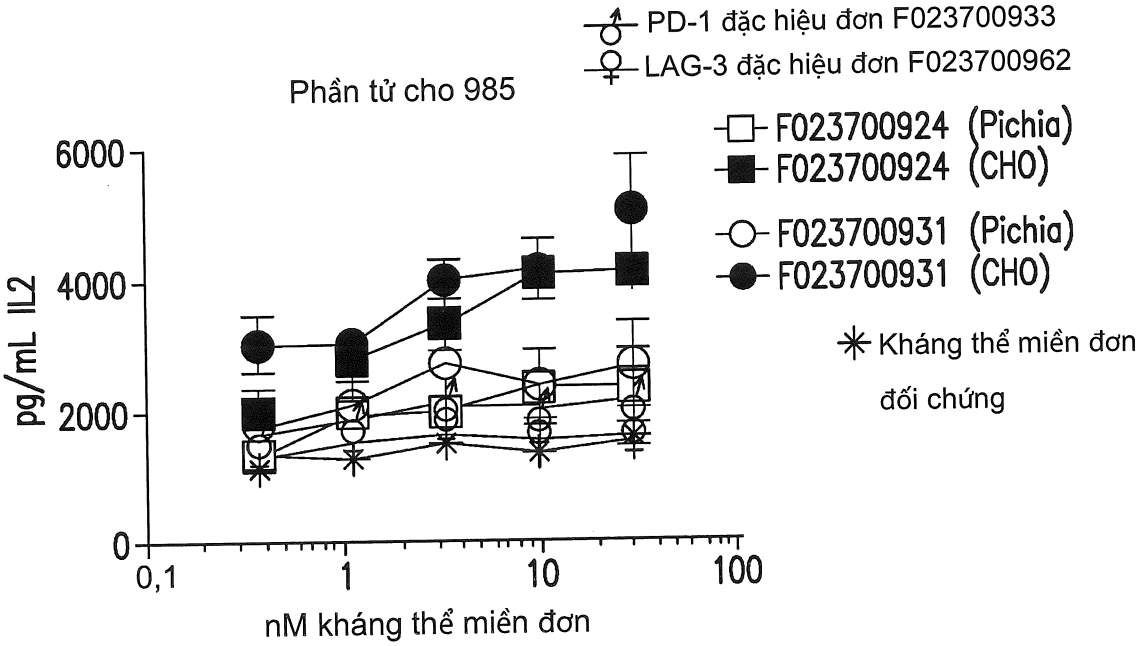


FIG.13F

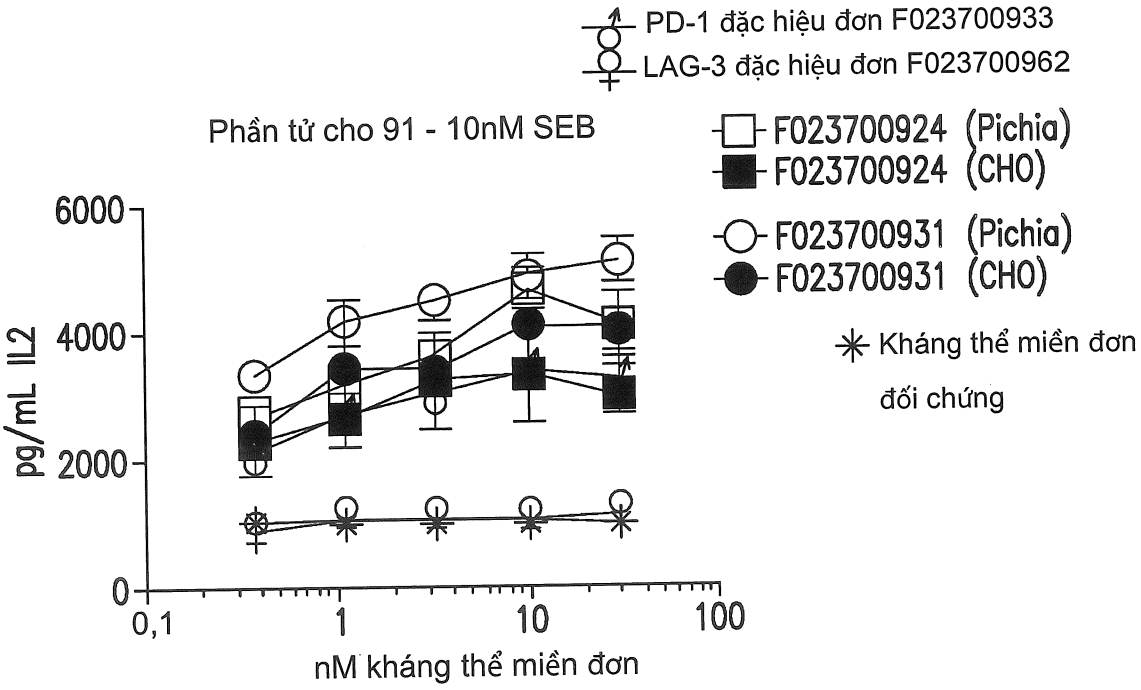


FIG.13G

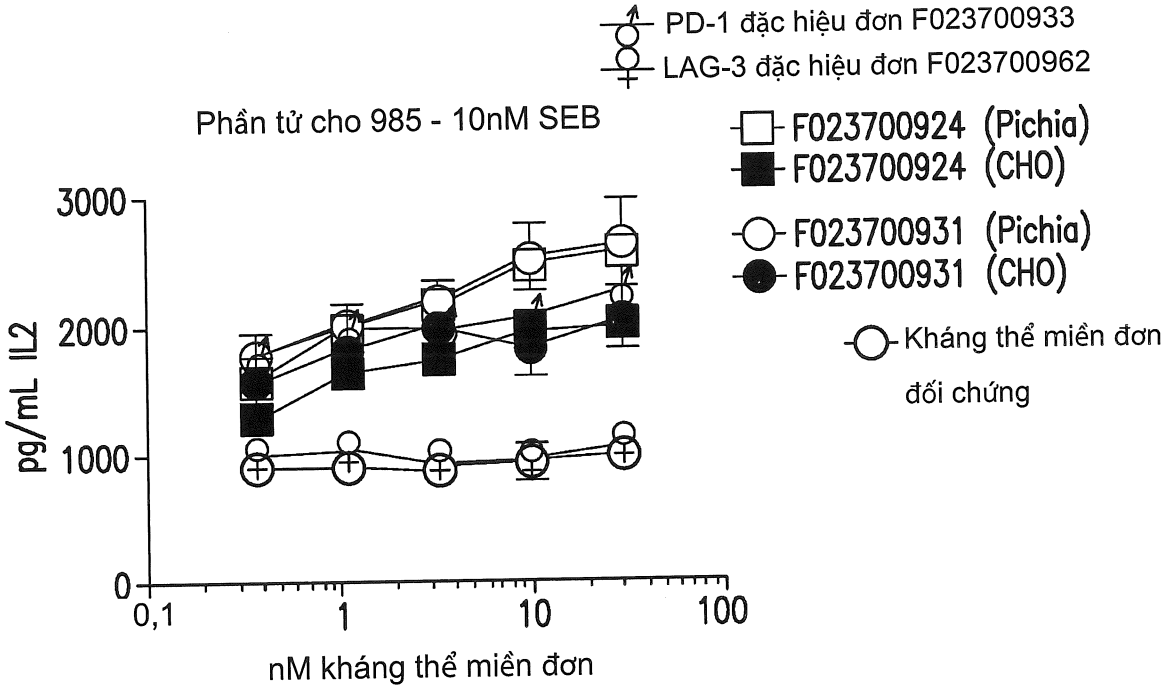


FIG.13H

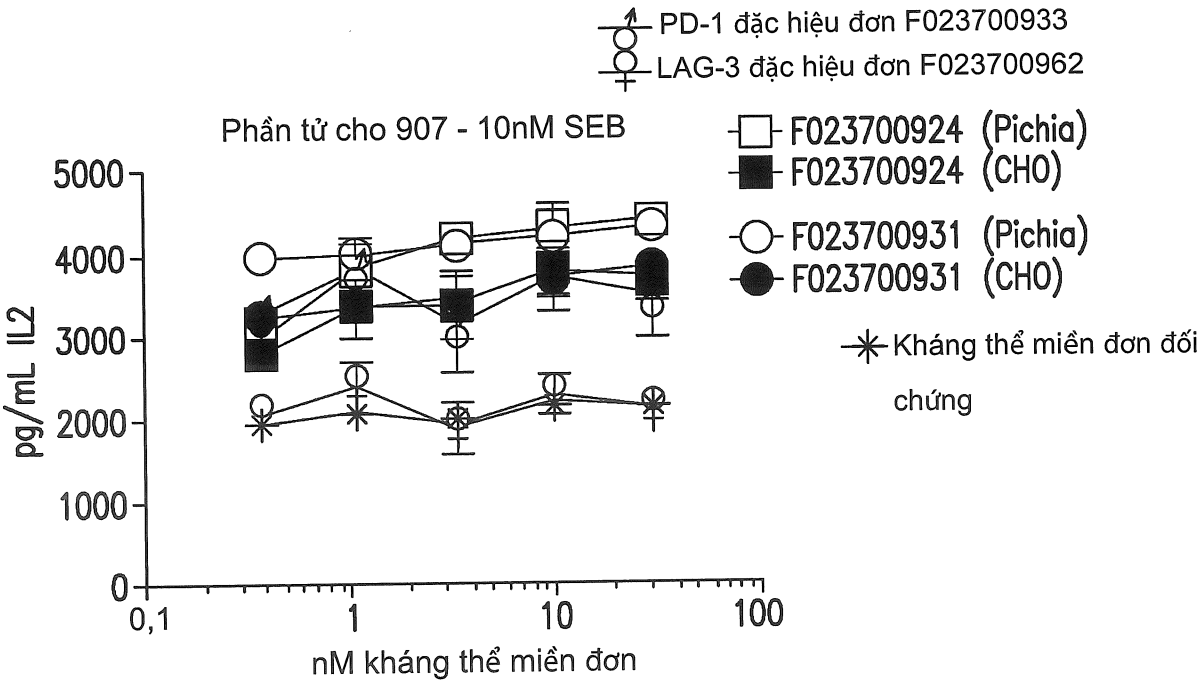


FIG.13I

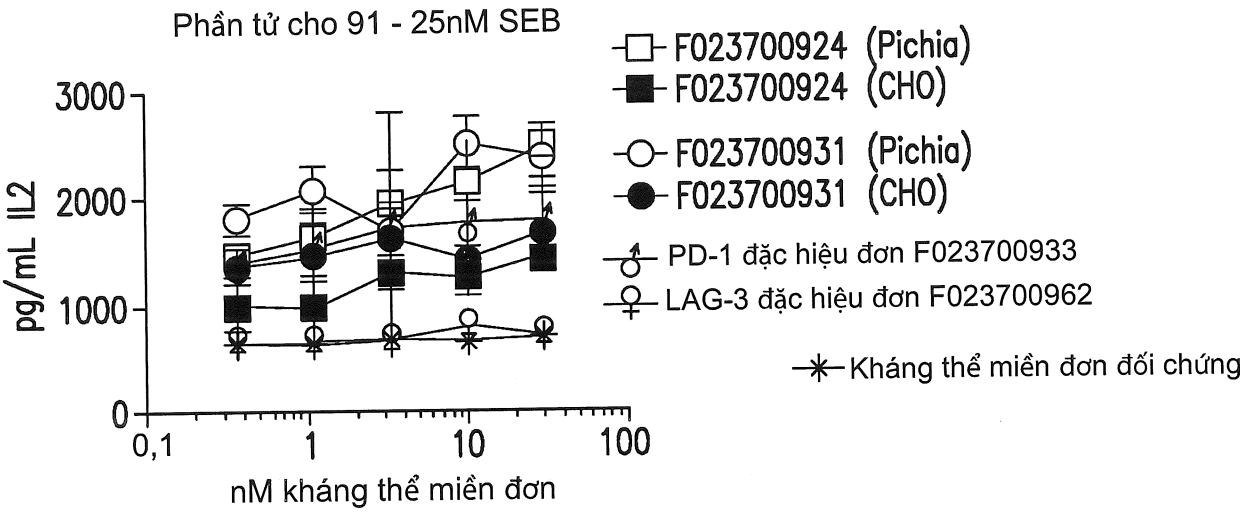


FIG.13J

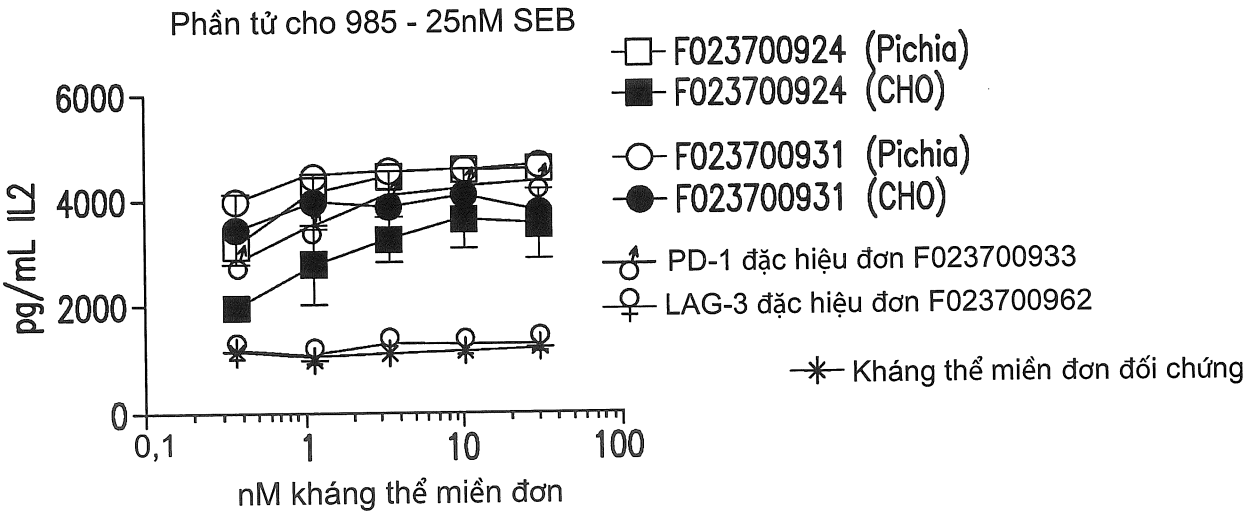


FIG.13K

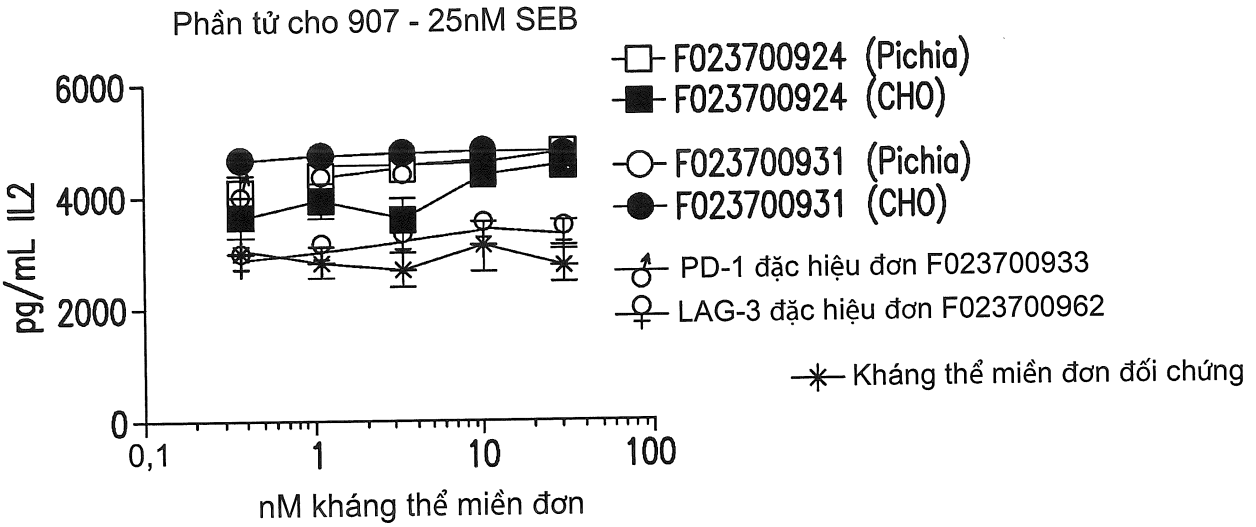


FIG.13L

Phần tử cho 91

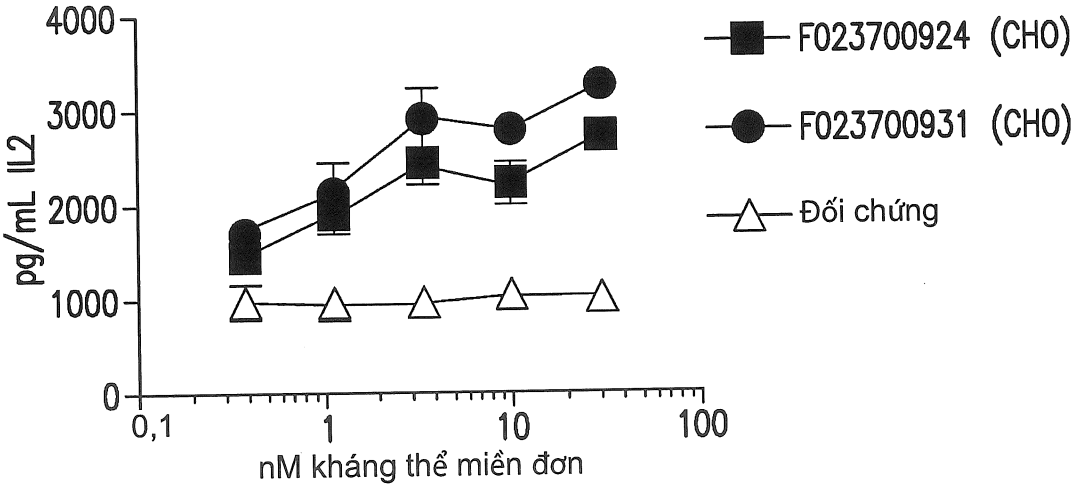


FIG.13M

Phần tử cho 985

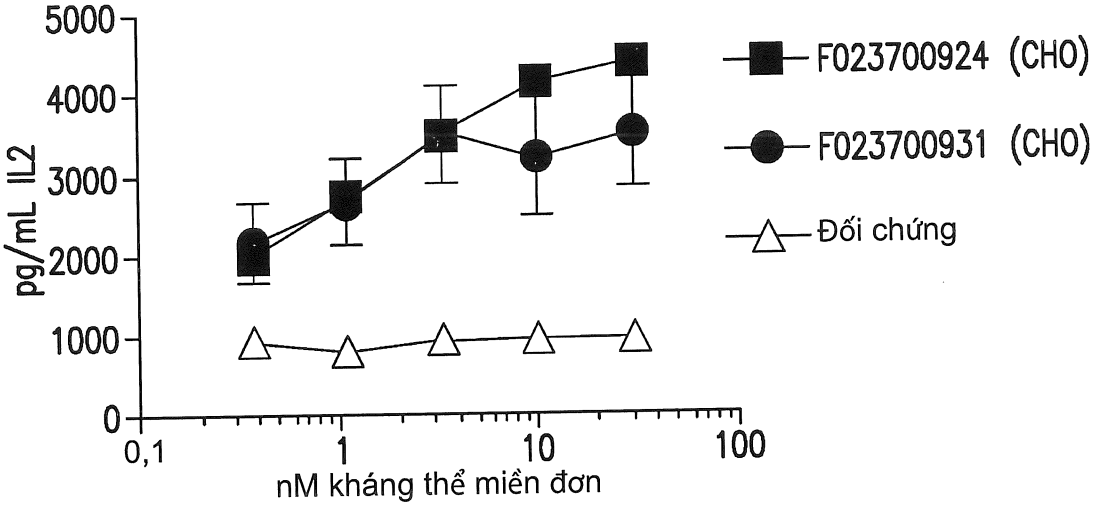


FIG.13N

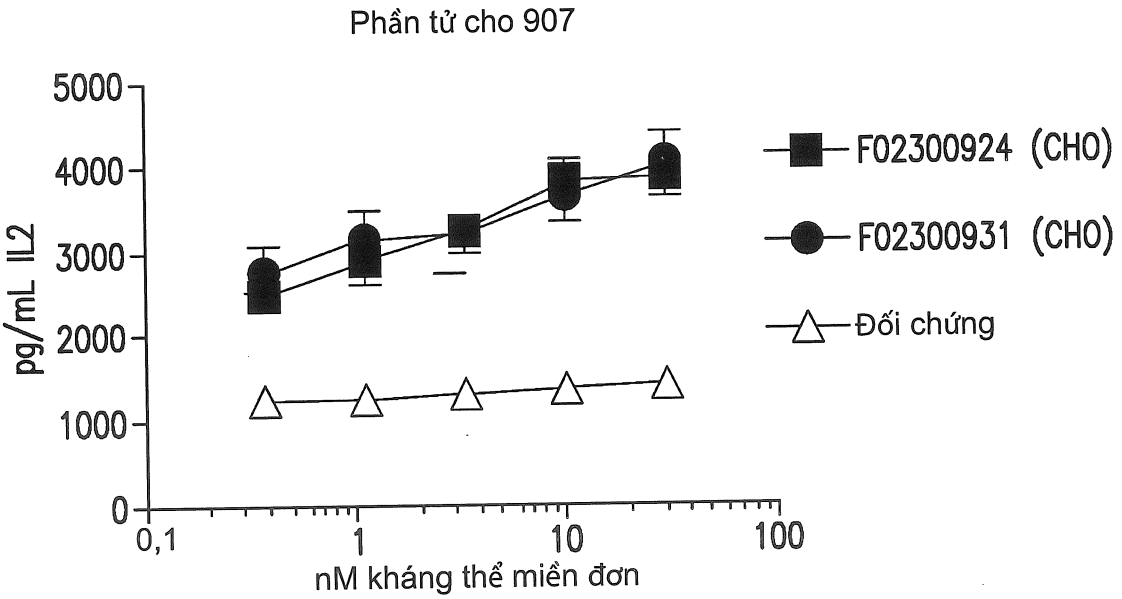


FIG.13O

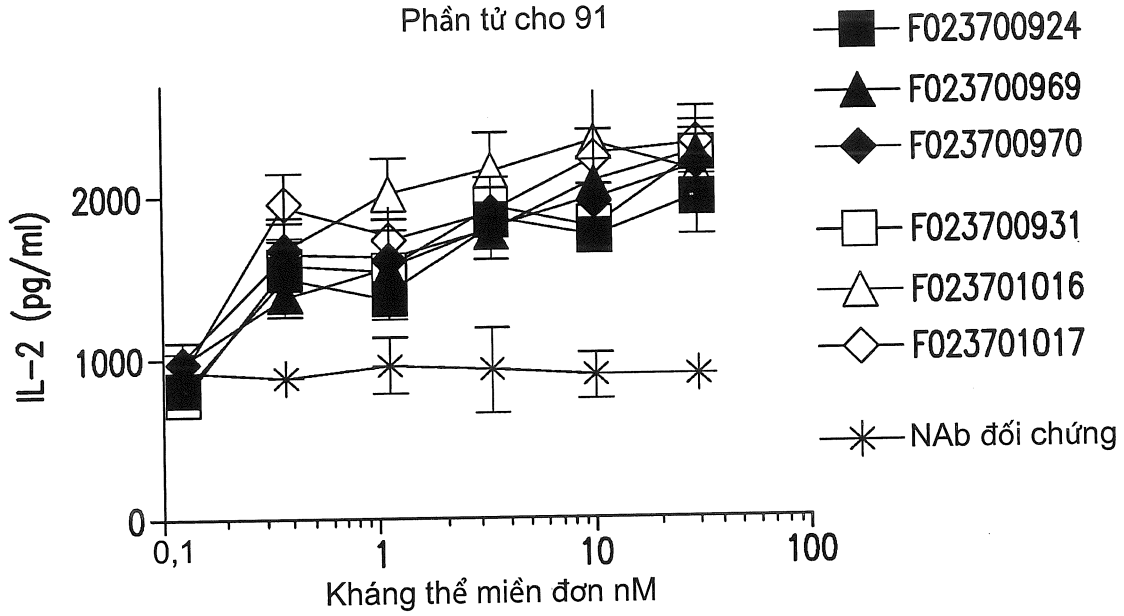


FIG.13P

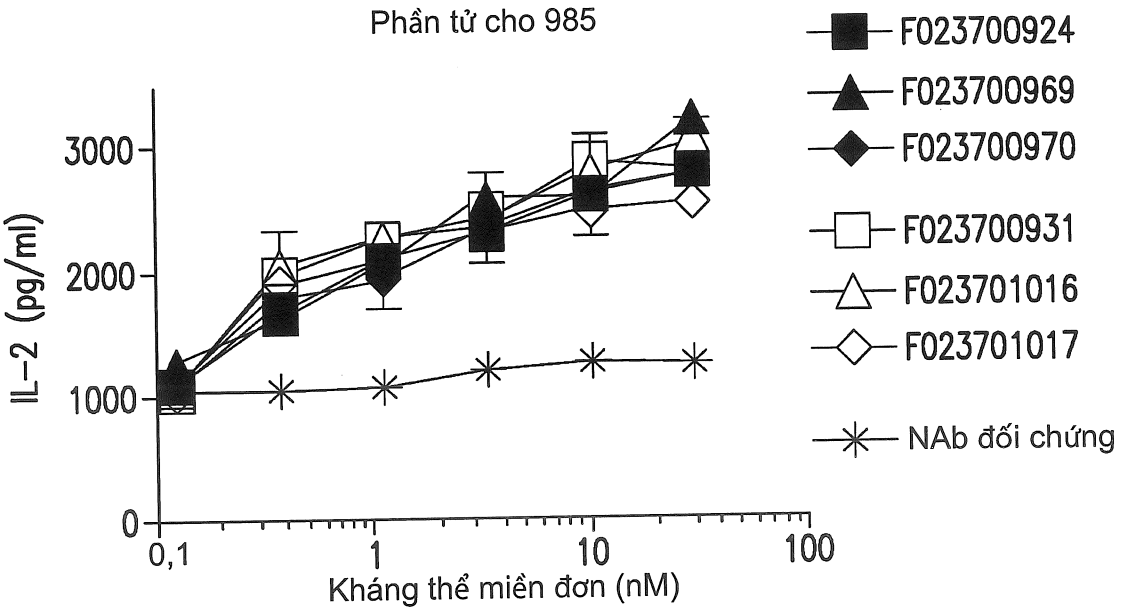


FIG.13Q

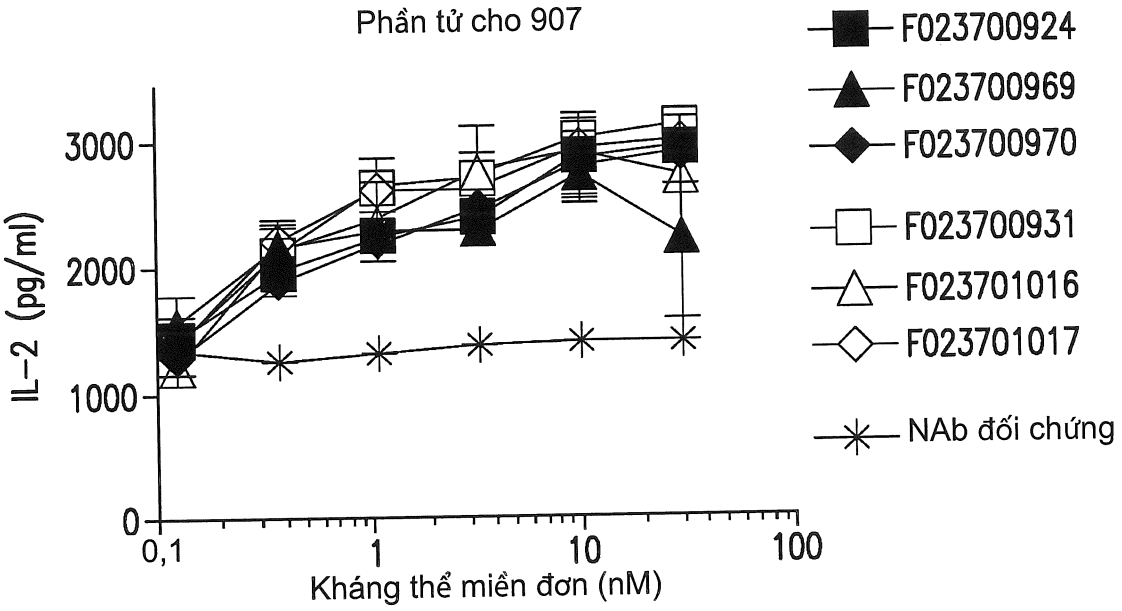


FIG.13R

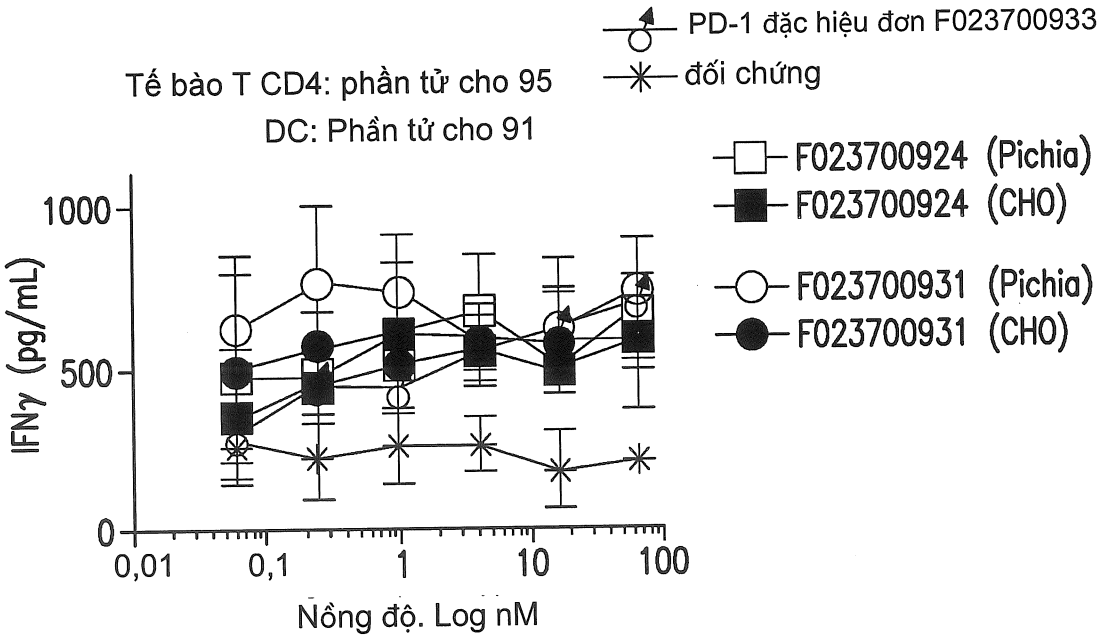


FIG.14A

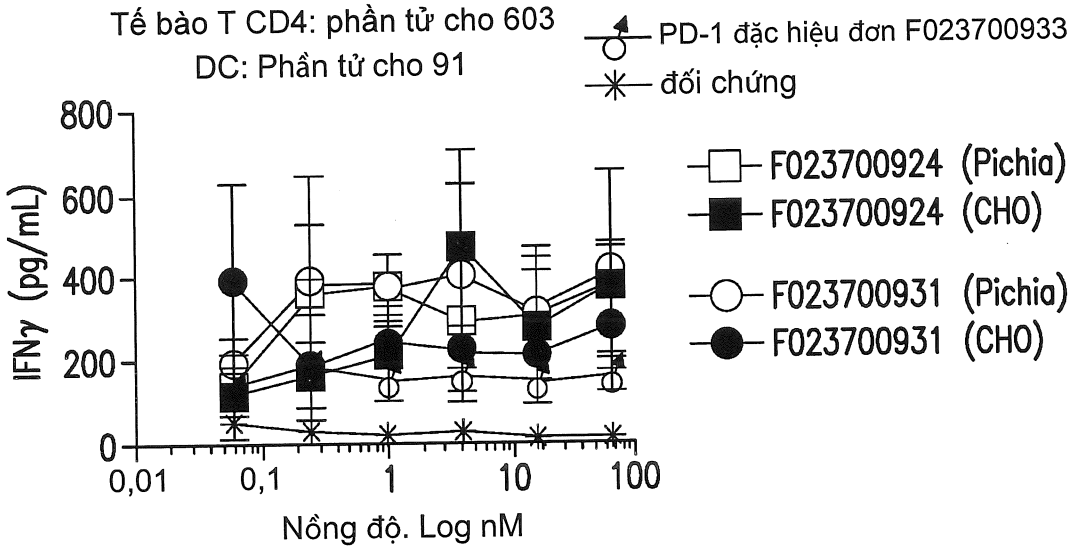


FIG.14B

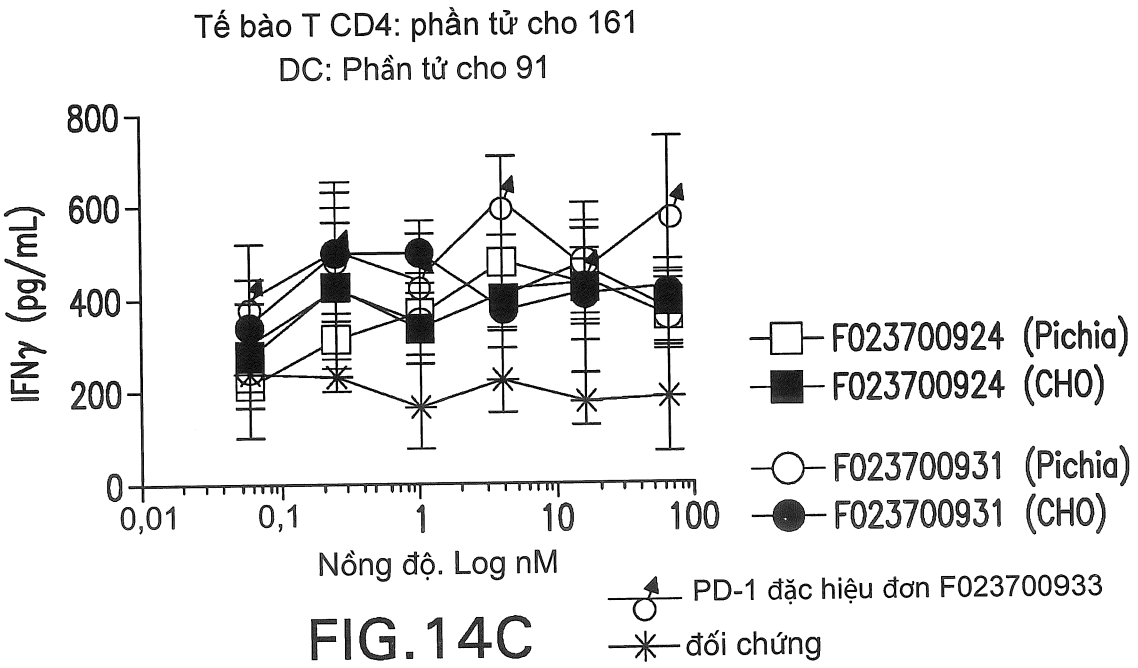


FIG.14C

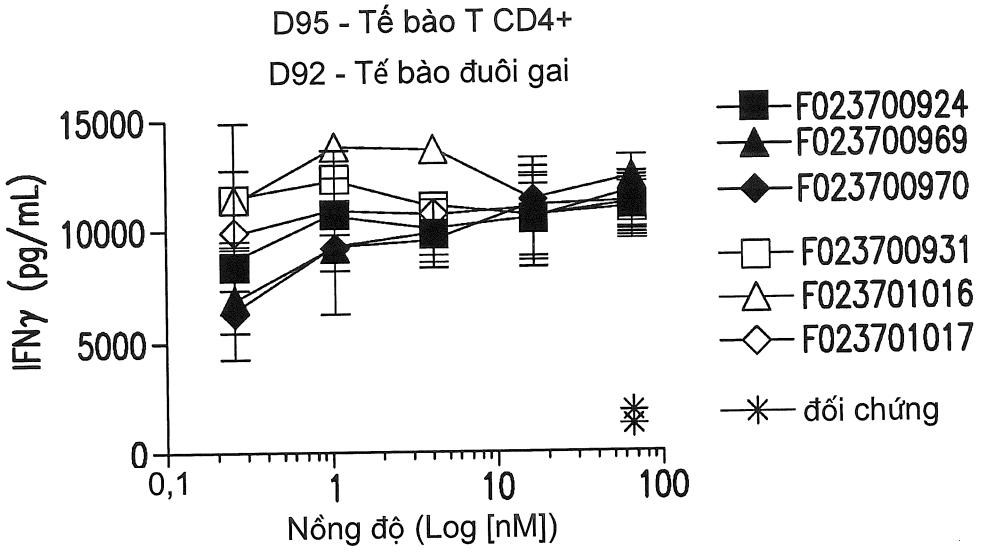


FIG.14D

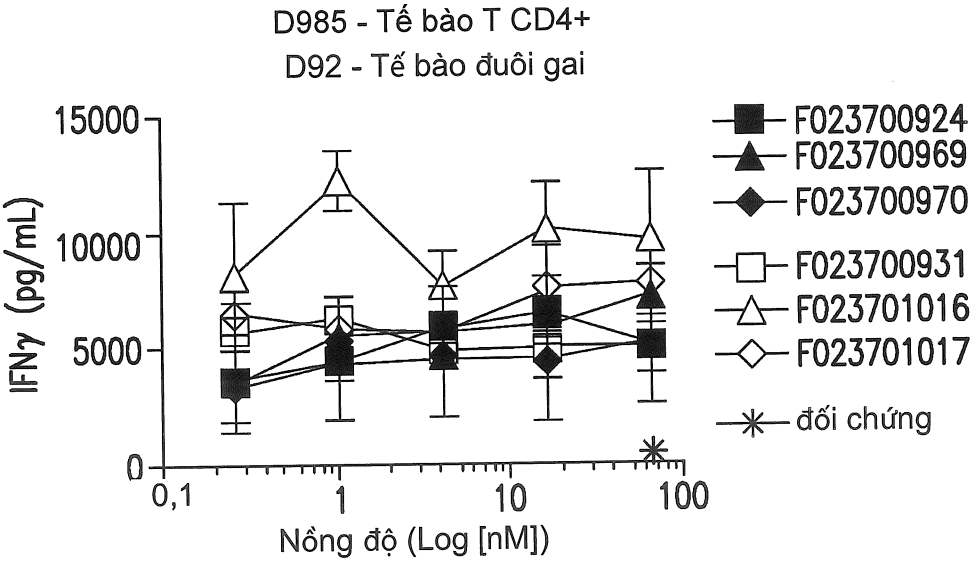


FIG.14E

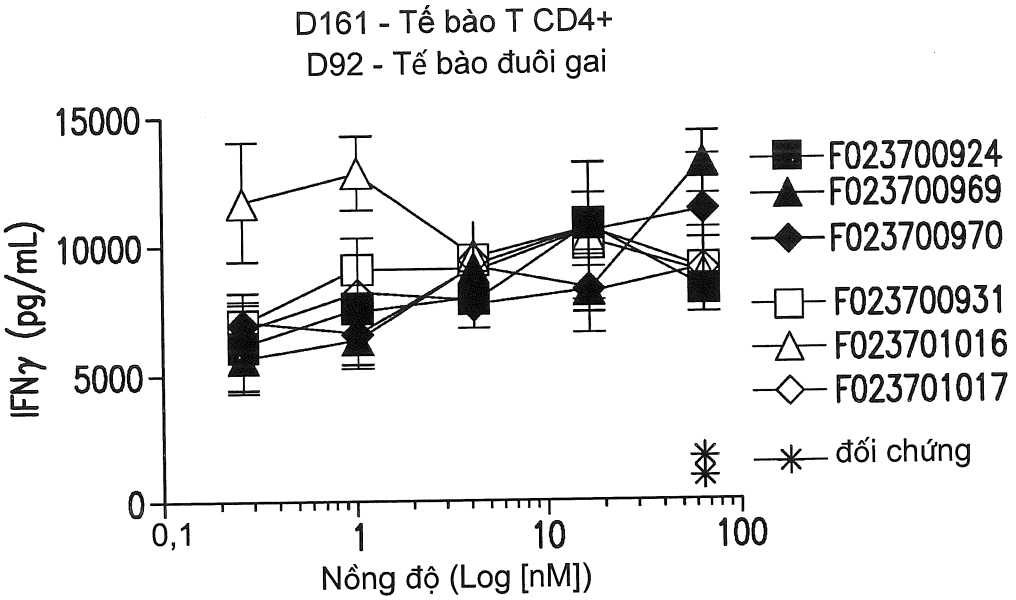


FIG.14F

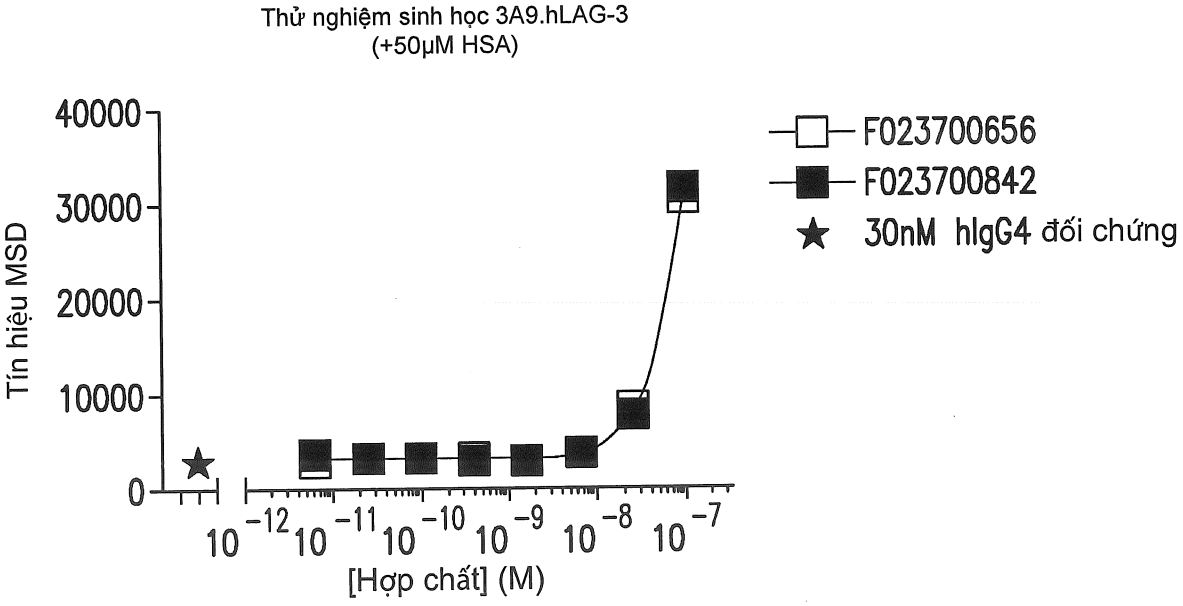


FIG.15A

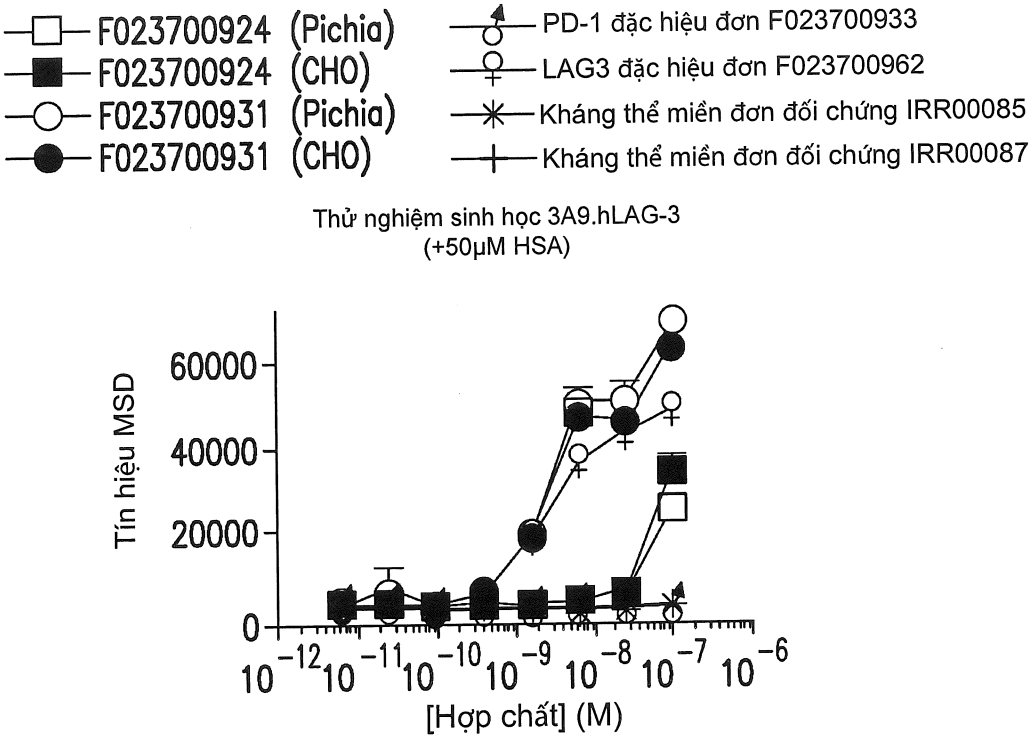


FIG.15B

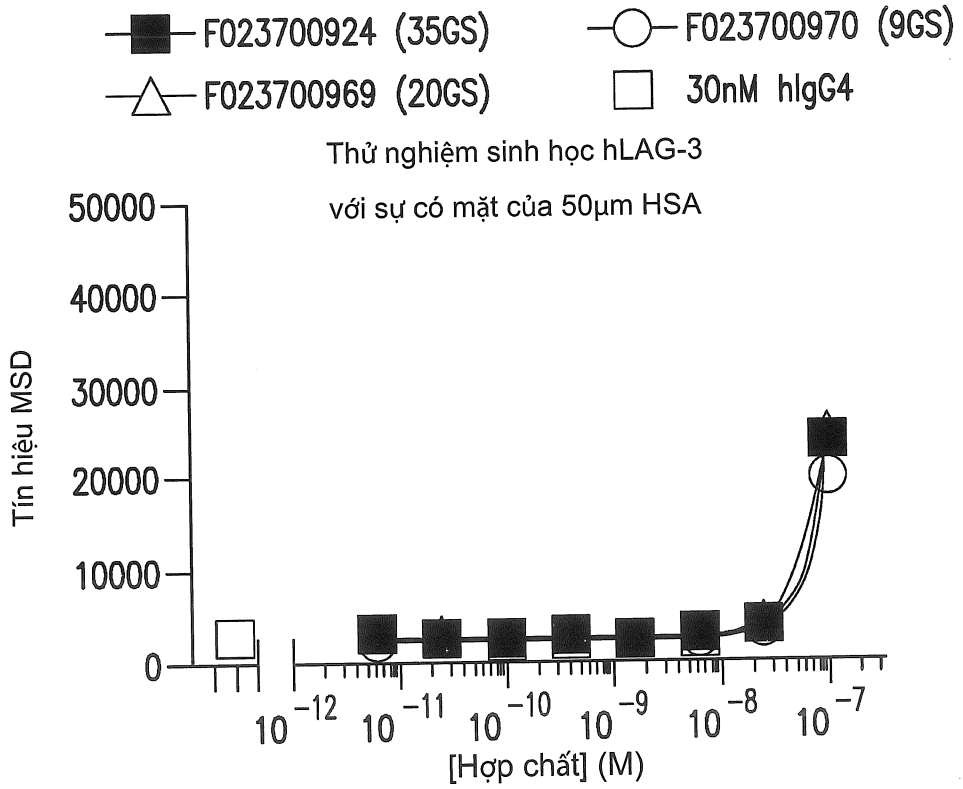


FIG.15C

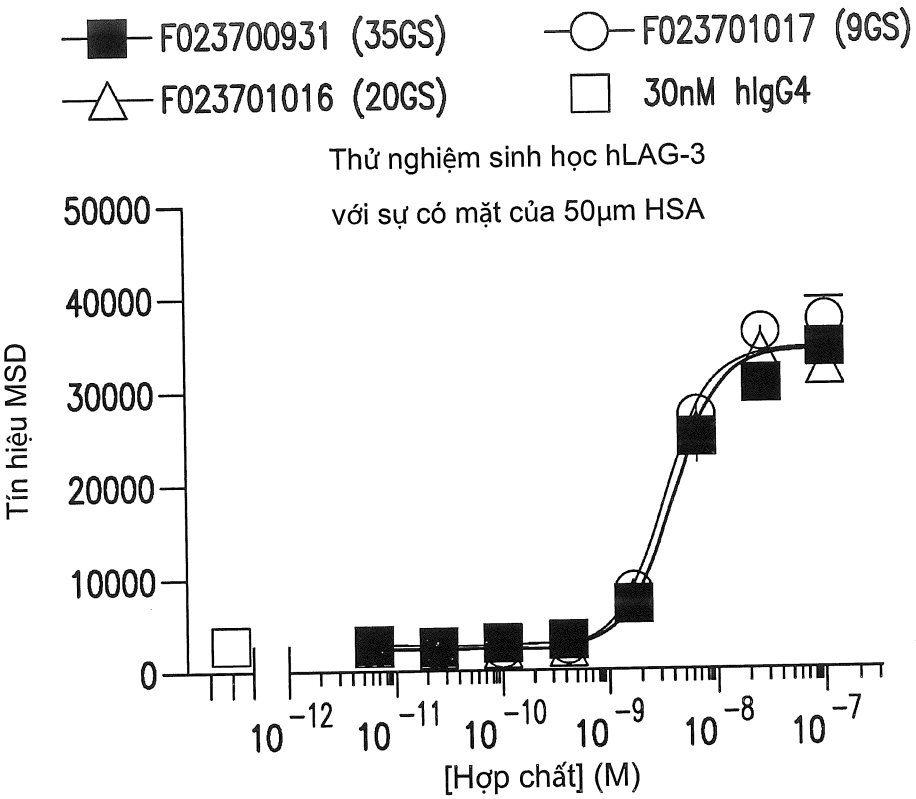
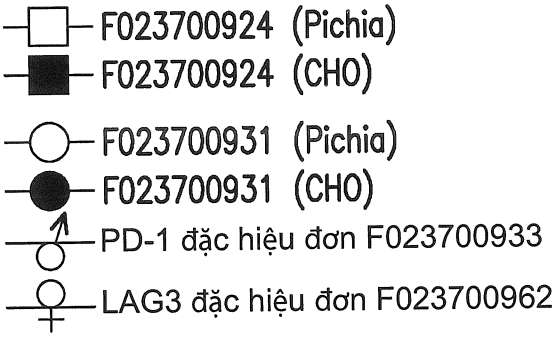


FIG.15D


F023700924 (Pichia)
F023700924 (CHO)
F023700931 (Pichia)
F023700931 (CHO)
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG3 đặc hiệu đơn F023700962

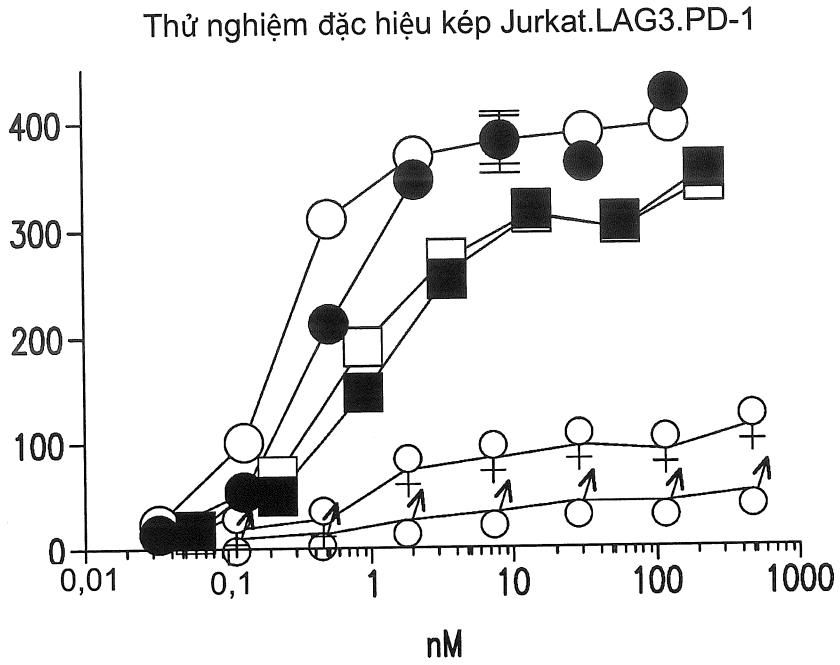

Thử nghiệm đặc hiệu kép Jurkat.LAG3.PD-1
400
300
200
100
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
nM

FIG.16A

43/66

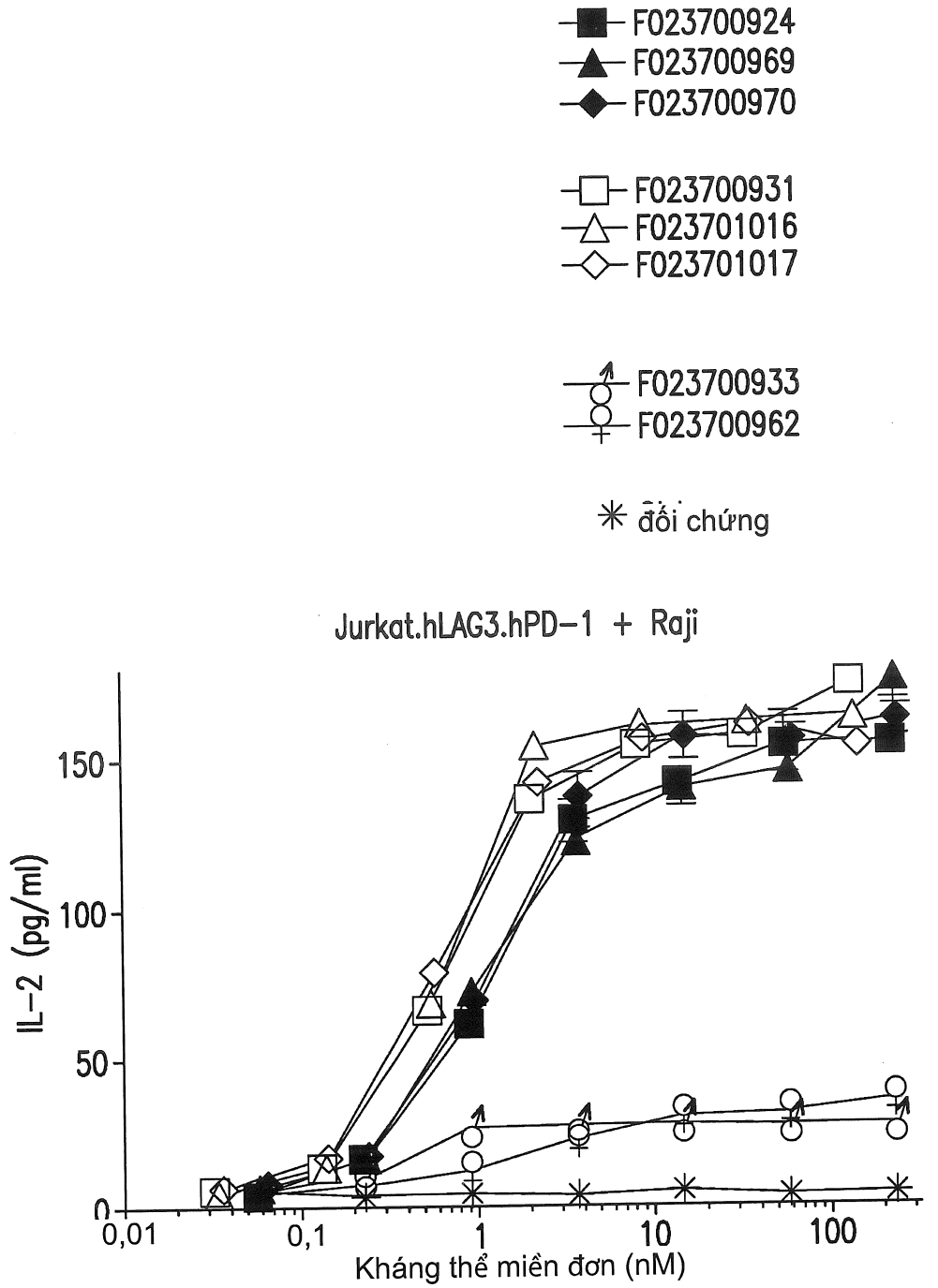
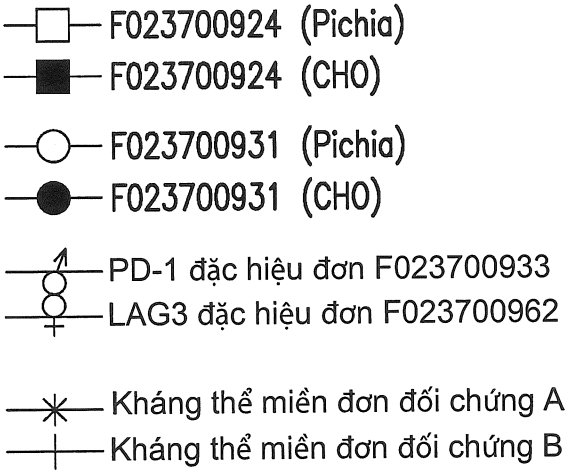

F023700924
F023700969
F023700970
F023700931
F023701016
F023701017
F023700933
F023700962
đối chứng
Jurkat.hLAG3.hPD-1 + Raji
IL-2 (pg/ml)
150
100
50
0
0,01
0,1
1
10
100
Kháng thể miền đơn (nM)

FIG.16B


F023700924 (Pichia)
F023700924 (CHO)
F023700931 (Pichia)
F023700931 (CHO)
PD-1 đặc hiệu đơn F023700933
LAG3 đặc hiệu đơn F023700962
Kháng thể miền đơn đối chứng A
Kháng thể miền đơn đối chứng B

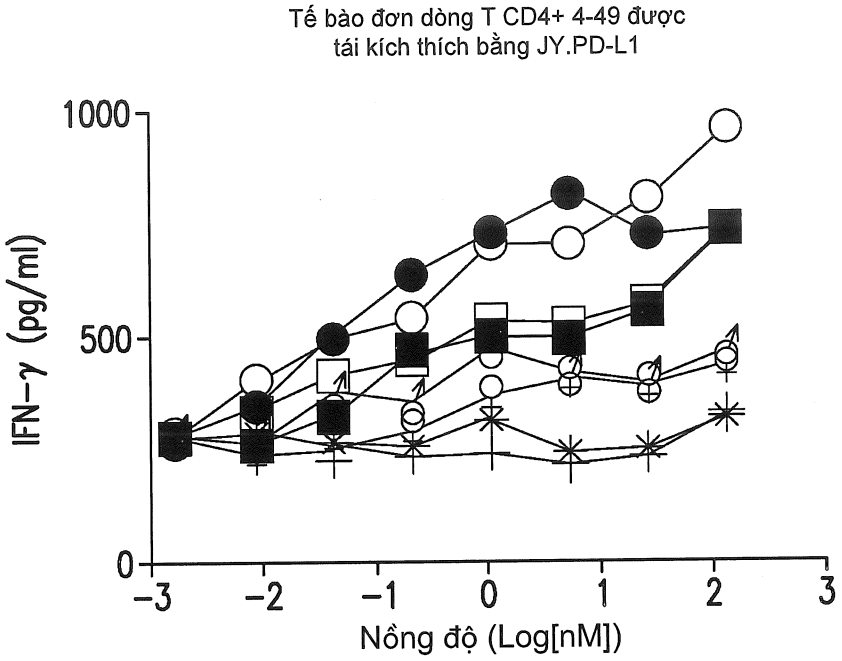

Tế bào đơn dòng T CD4+ 4-49 được tái kích thích bằng JY.PD-L1
IFN-γ (pg/ml)
1000
500
0
−3
−2
−1
0
1
2
3
Nồng độ (Log[nM])

FIG.17A

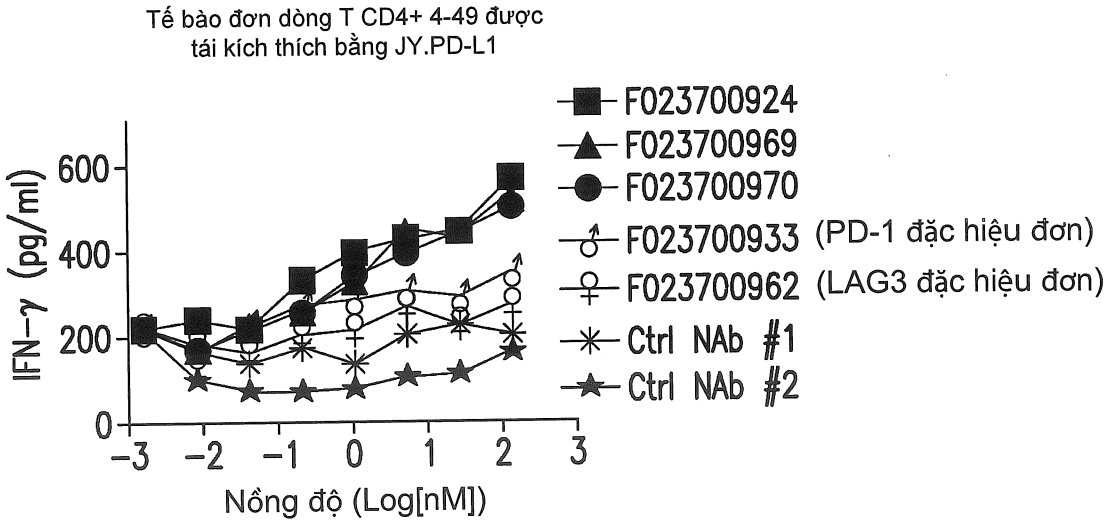


FIG.17B

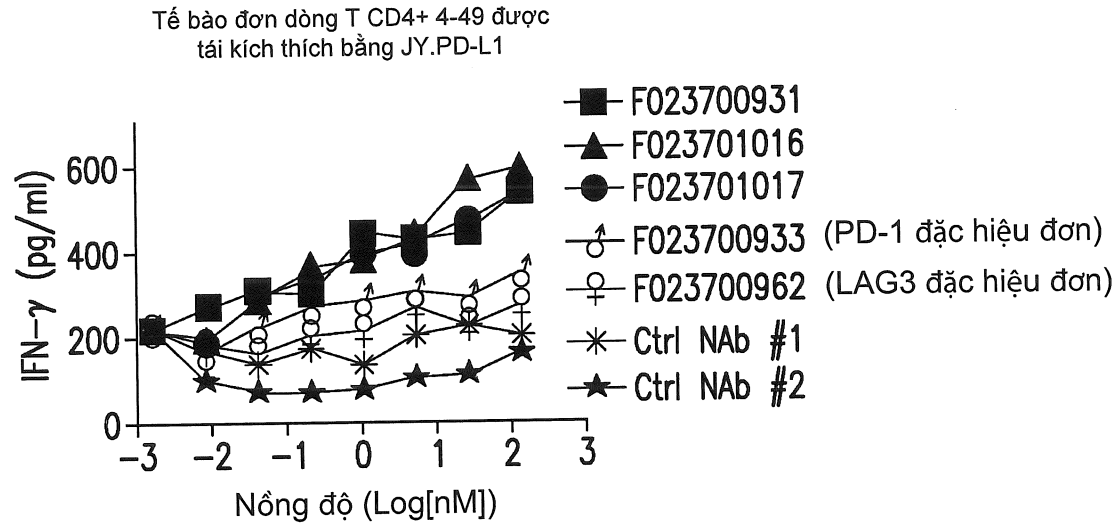


FIG.17C

	Chất phản ứng	Mô tả	Đích	Trình tự
611B09 gốc	F0237611B09	F0237611B09-FLAG3-HIS6 (SEQ ID NO: 128)	hLAG-3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQARGNEREFVAAISESGGR THYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATTLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLVTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
611B09 với E1D	F023700656	F0237611B09(E1D)-HIS6 (SEQ ID NO: 129)	hLAG-3	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQARGNEREFVAAISESGGR THYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATTLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLVTVSSAAAHHHHHH
monome SO 611B09	F023700842	F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-FLAG3-HIS6 (SEQ ID NO: 130)	hLAG-3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGR THYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLVTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
SO 611B09 + ALB201 đơn trị	F023701128	F0237611B09(E1D,L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 96)	hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGR THYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG.18A

SO 611B09 + ALB201 hóa trị hai	F023700962	F0237611B09(E1D,L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 97)	hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGR THYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGN SLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRD NAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
SO 1PD102C 12 một phần	F023700275	1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-FLAG3-HIS6 (SEQ ID NO: 131)	hPD-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTL VTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
Monome SO 1PD102C 12	F023700706	1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6 (SEQ ID NO: 132)	hPD-1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTL VTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

FIG.18B

Monome SO 1PD102C 12	F023700929	1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-HIS6 (SEQ ID NO: 133)	hPD-1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTL VTVSSHHHHHH
SO 1PD102C 12 + ALB201 đơn trị	F023701127	1PD102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 101)	hPD-1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNS LRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
SO 1PD102C 12 + ALB201 hóa trị hai	F023700933	1PD102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 102)	hPD-1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT ALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG.18C

Monome SO 1PD102C 12 được tăng cường	F023701190	1PD102C12(E1D,L11V,A14P, W52aV,A74S,K83R,I89L,W10 0aF)-HIS6 (SEQ ID NO: 134)	hPD-1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSAAAHHHHHH
Monome SO 1PD102C 12 được tăng cường	F023701192	1PD102C12(E1D,L11V,A14P, W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89 L,W100aF)-HIS6 (SEQ ID NO: 135)	hPD-1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSAAAHHHHHH
Monome SO 1PD102C 12 được tăng cường	F023701193	1PD102C12(E1D,L11V,A14P, W52aV,N73P,A74S,K83R,I89 L,W100aF)-HIS6 (SEQ ID NO: 136)	hPD-1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSAAAHHHHHH

FIG.18D

Pentame #1	F023700899	1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-35GS-1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-35GS-F023611B09-35GS-F0237611B09-35GS-ALB11 (SEQ ID NO: 106)	hPD-1/hLAG3	EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYVM GWFRQARGNEREFVAAISESGGRTHYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDT AVYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQARG NEREFVAAISESGGRTHYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATT LLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSS

FIG.18E

Pentame	F023700931	1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R, I89L)-35GS-1PD102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) -35GS-F0237600B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62 S,A74S,K83R,V89L)-35GS-F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62 S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 107)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVM GWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPG KEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATT LLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSA

FIG.18F

Pentame với 20GS	F023701016	102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-20GS-102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-20GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,89L)-20GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L-20GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 108)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVAMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG.18G

Pentame với 9GS	F023701017	102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-9GS-102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-9GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-9GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,89L)-9GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 109)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Trime	F023700924	1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 110)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG.18H

Trime với 20GS	F023700969	102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-20GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-20GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 111)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Trime với 9GS	F023700970	102C12(E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-9GS-F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-9GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 112)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG. 18I

Pentame /35GS	F023701163	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 113)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDP SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVM GWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPG KEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATT LLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSA

FIG.18J

Pentame /9GS	F023701168	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–9GS–1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–9GS–F023700842–9GS–F023700842–9GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 114)	hPD–1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGK EREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDK HQSSFYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTF SDYYMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYYMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Trime/ 35GS	F023701173	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS–F023700842–35GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 115)	hPD–1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGRTFSDYYMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG.18K

Trime /9GS	F023701178	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 116)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGK EREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTL LWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Pentame /35GS	F023701161	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 117)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDQ SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVM GWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPG KEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATT LLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSA

FIG.18L

Pentame /9GS	F023701166	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 118)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGK EREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDK HQSSFYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTF SDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Trime /35GS	F023701171	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 119)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG.18M

Trime /9GS	F023701176	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 120)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDQSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGK EREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTL LWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Pentame /35GS	F023701162	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 121)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDS SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVM GWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPG KEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATT LLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSA

FIG.18N

Pentame /9GS	F023701167	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 122)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGK EREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDK HQSSFYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTF SDYWMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYWMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Trime /35GS	F023701172	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 123)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGRTFSDYWMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG.18O

Trime /9GS	F023701177	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-ALB1102-A (SEQ ID NO: 123)	hPD-1/hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYYMGWFRQAPGK EREFVAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTL LWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

FIG.18P

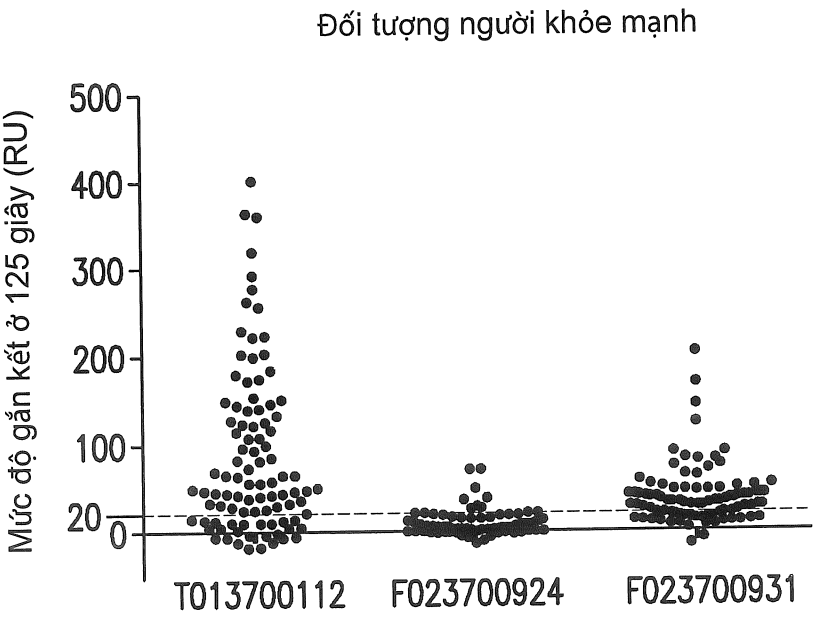


FIG.19A

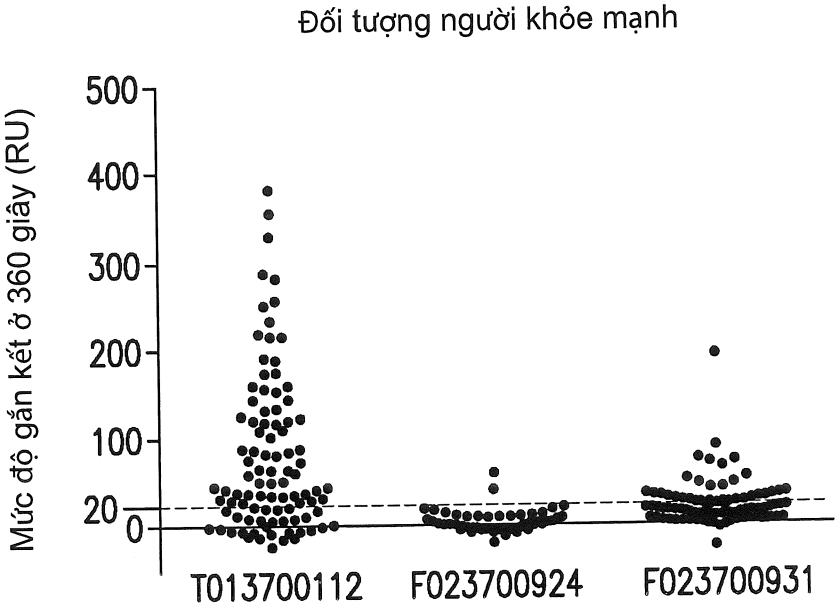


FIG.19B

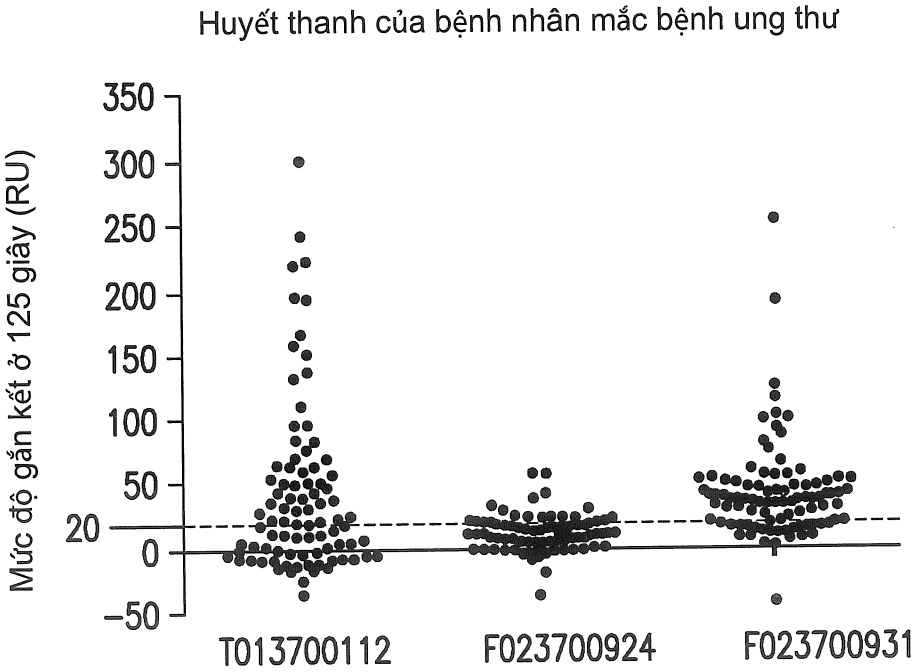


FIG.19C

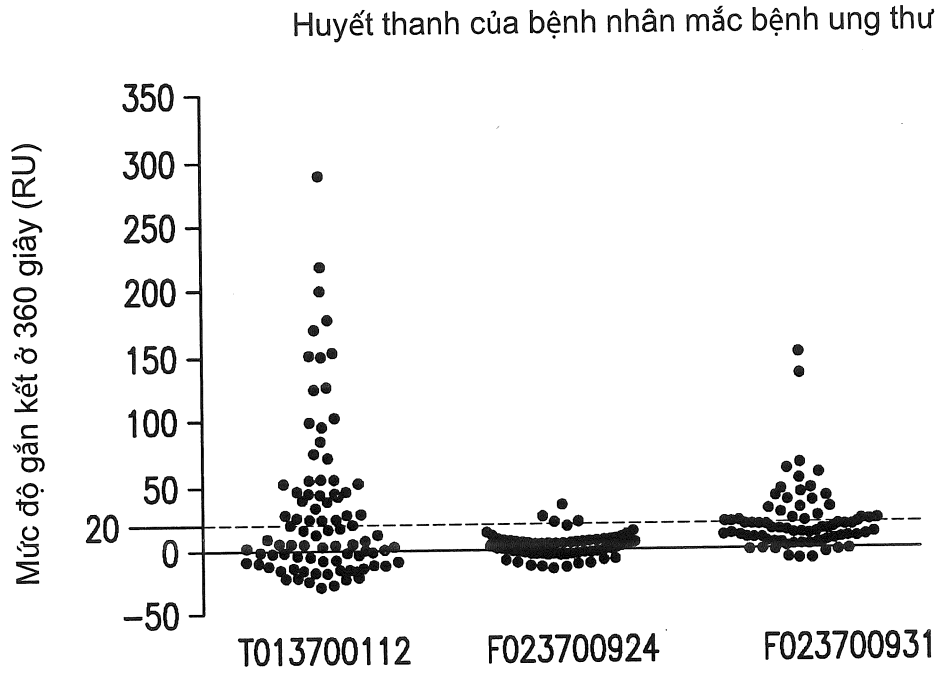


FIG.19D

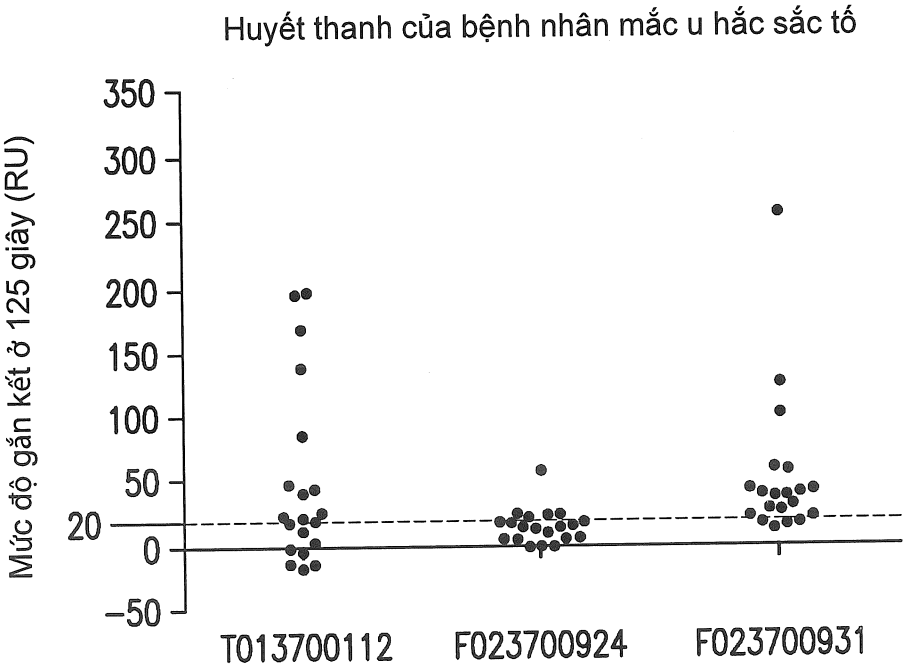


FIG.19E

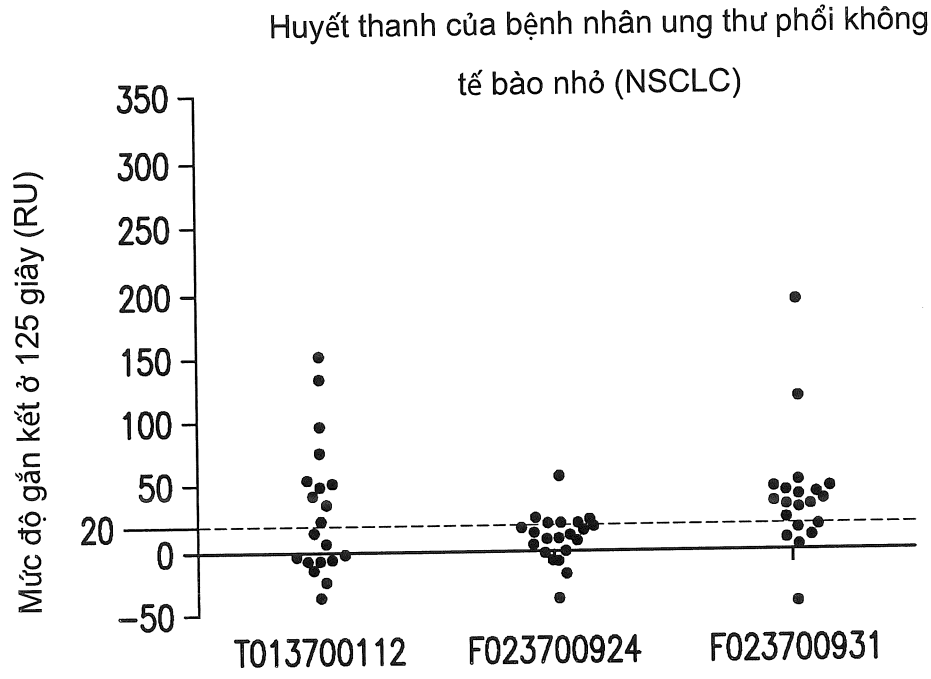


FIG.19F

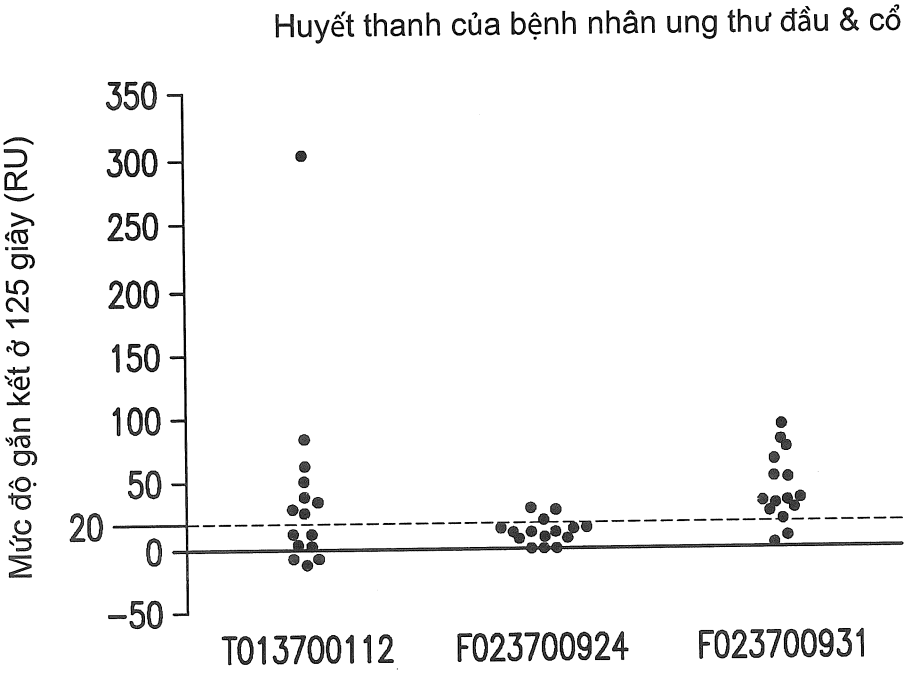


FIG.19G

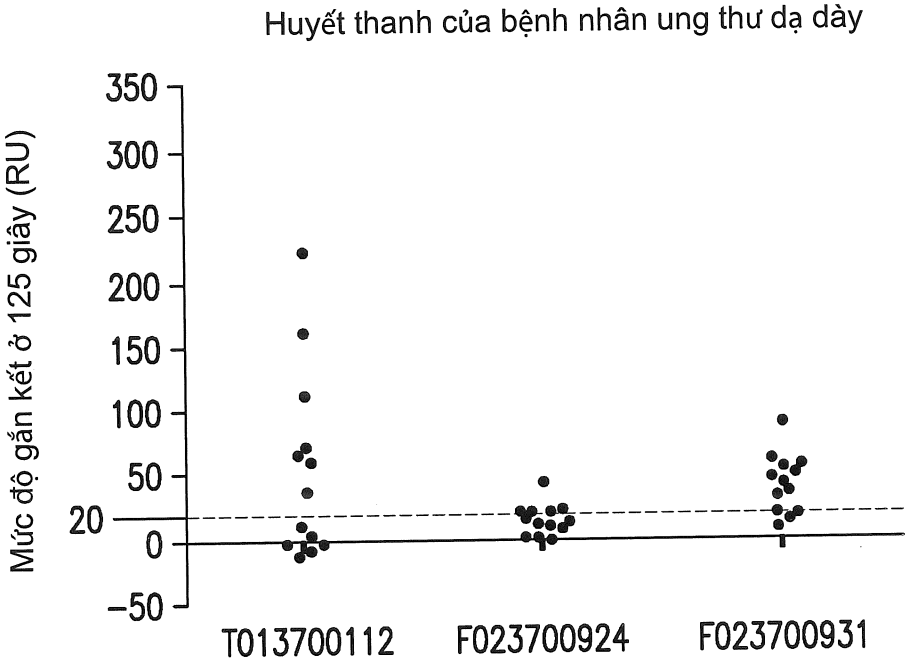


FIG.19H

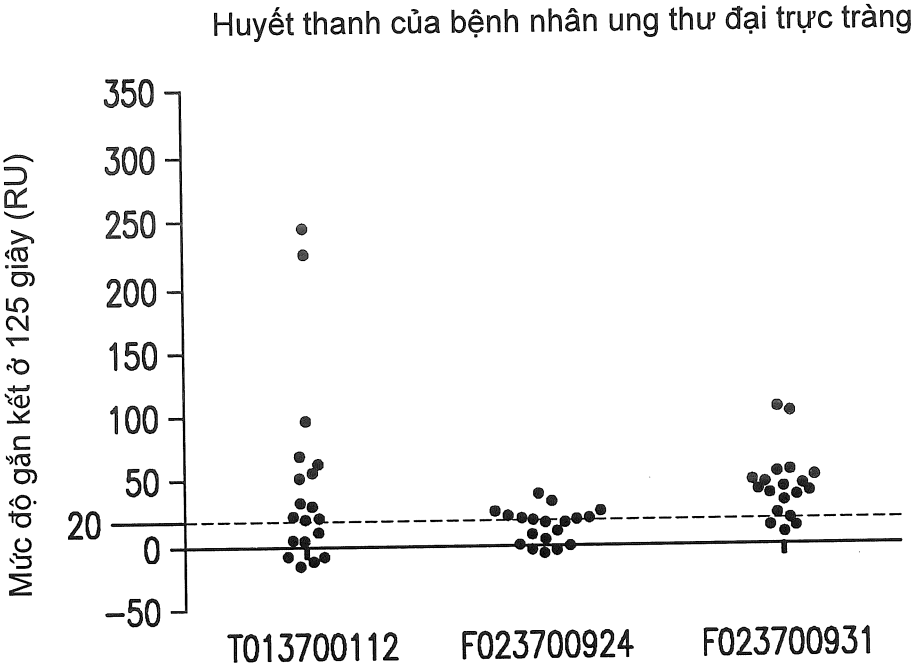

Huyết thanh của bệnh nhân ung thư đại trực tràng
Mức độ gắn kết ở 125 giây (RU)
350
300
250
200
150
100
50
20
0
−50
T013700112
F023700924
F023700931

FIG.19I

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Merck, Sharp & Dohme Corp.

<120> Chất gắn kết PD1 và/hoặc LAG3 và chế phẩm chứa chất gắn kết này

<130> 24238

<150> 62/257,009
<151> 2015-11-18

<160> 138

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 3

Ile His Ala Met Gly
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X là W hoặc V

<400> 4

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

Gly

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X là W hoặc F

<400> 5

Asp Lys His Gln Ser Ser Xaa Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 6

Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X là W hoặc V

<400> 7

Val Ile Thr Xaa Ser Gly Gly Ile Thr Tyr
1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X là W hoặc F

<400> 8

Asp Lys His Gln Ser Ser Xaa Tyr Asp Tyr
1 5 10

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

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Lys Ser
115

<210> 13
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Gln Ser
115

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Lys Val Ser Ser

115

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Lys Ser
115

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Gln Ser
115

<210> 18
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Lys Ser

115

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Gln Ser
115

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 23

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 24

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 26
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala
115 120

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

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 28
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala

115 120

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 31
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 32
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 32

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala
115 120

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala
115 120

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

```
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120
```

<210> 40
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 40

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 41
<211> 34
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thẻ HIS6-FLAG3

<400> 41

His His His His His His Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly
20 25 30

Ala Ala

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 42

Val Thr Val Lys Ser
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 43

Val Thr Val Gln Ser
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 44

Val Lys Val Ser Ser
1 5

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 45

Val Gln Val Ser Ser
1 5

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 46

Val Thr Val Lys Ser Xaa
1 5

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 47

Val Thr Val Gln Ser Xaa
1 5

<210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 48

Val Lys Val Ser Ser Xaa
1 5

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 49

Val Gln Val Ser Ser Xaa
1 5

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 50

Val Thr Val Lys Ser Ala
1 5

<210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 51

Val Thr Val Gln Ser Ala
1 5

<210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 52

Val Lys Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 53

Val Gln Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 54

<211> 5
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 54

Val Thr Val Ser Ser
1 5

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên

<400> 55

Val Thr Val Ser Ser Xaa
1 5

<210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 56

Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 57
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 57

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

```
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 58
<211> 35
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thành phần liên kết 35GS

<400> 58

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1               5                   10                  15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            20                  25                  30
```

Gly Gly Ser
35

<210> 59
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X là L hoặc V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(93)
<223> X là L hoặc V

<400> 59

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala
115

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 60

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

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 61

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

Gly

<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 62

Gly Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 63
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 63

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

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

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Arg Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
100 105 110

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 64
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

```
1               5                   10                  15

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

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

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
            100                 105                 110

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125


<210>  65
<211>  10
<212>  PRT
<213>  Lama sp.

<400>  65

Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly
1               5                   10


<210>  66
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Lama sp.


<220>
```

<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X là A hoặc S

<400> 66

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

Gly

<210> 67
<211> 19
<212> PRT
<213> Lama sp.

<400> 67

Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp
1 5 10 15

Tyr Asp Tyr

<210> 68
<211> 34
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 68

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ala Ala His His His His
20 25 30

His His

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự thẻ HisX6

<400> 69

Ala Ala Ala His His His His His His
1 5

<210> 70
<211> 35
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thành phần liên kết 35GS

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 71

Lys Thr Ser Gln Asn Ile Phe Glu Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 72

Asn Ala Ser Pro Leu Gln Ala
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 73

His Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr
1 5

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 74

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

<210> 75
<211> 17
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 75

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

Gly

<210> 76

<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 76

His Arg Gly Phe Ser Val Trp Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 77

Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 78

Thr Phe Ile Pro Leu Leu Asp Thr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

<210> 79
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 79

Met Gly Val Thr His Ser Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 80

Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ile Ser Val His
1 5 10

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 81

Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 82

Gln Gln Thr Phe Ser Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 83

Gly Phe Ile Ile Lys Ala Thr Tyr Met His
1 5 10

<210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 84

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Glu Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Val

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 85

Tyr Ala Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 86

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 87

His Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 88

Gln His Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 89

<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuột nhắt được làm giống người

<400> 89

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr 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> 90
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuột nhắt được làm giống người

<400> 90

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 Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 91
<211> 440
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            100                 105                 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
        115                 120                 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
    130                 135                 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
            180                 185                 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
        195                 200                 205
```

```
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
    210                 215                 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225                 230                 235                 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
                245                 250                 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
            260                 265                 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
        275                 280                 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
    290                 295                 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305                 310                 315                 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
                325                 330                 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
            340                 345                 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
        355                 360                 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
    370                 375                 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385                 390                 395                 400
```

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 92
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

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 Val 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 Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 93
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thẻ HisX6

<400> 93

His His His His His His
1 5

<210> 94
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thẻ HisX18

<400> 94

His His His His His His His His His His His His His His His His
1 5 10 15

His His

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 95

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 96
<211> 279
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 96

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
            100                 105                 110

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
                165                 170                 175

Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
            180                 185                 190

Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala
    210                 215                 220

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr
225                 230                 235                 240

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu
                245                 250                 255

Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr
```

260 265 270

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
275

<210> 97
<211> 442
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 97

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
100 105 110

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
                165                 170                 175

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
            180                 185                 190

Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg
        195                 200                 205

Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala
    210                 215                 220

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
225                 230                 235                 240

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu
                245                 250                 255

Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro
            260                 265                 270

Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
        275                 280                 285

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
```

325 330 335

Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
340 345 350

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
355 360 365

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
370 375 380

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
385 390 395 400

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
405 410 415

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
420 425 430

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
435 440

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 98

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

```
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 99
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 99

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 100
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thành phần liên kết 20GS

<400> 100

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1               5                   10                  15

Gly Gly Gly Ser
            20
```

<210> 101
<211> 270
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 101

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

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
        195                 200                 205

Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
```

```
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
                245                 250                 255

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
            260                 265                 270
```

<210> 102
<211> 424
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 102

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

```
Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Val Ile Thr Trp Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Lys His Gln
                245                 250                 255

Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
```

```
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
305                 310                 315                 320

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
                325                 330                 335

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
            340                 345                 350

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
        355                 360                 365

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
    370                 375                 380

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
                405                 410                 415

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
            420
```

<210> 103
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 103

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

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 104
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 104

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
```

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 105
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 105

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Pro Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
```

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 106
<211> 749
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 106

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
```

```
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Val Ile Thr Trp Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Lys His Gln
                245                 250                 255

Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300
```

```
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
305                 310                 315                 320

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
                325                 330                 335

Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Arg Gly Asn Glu
            340                 345                 350

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr
        355                 360                 365

Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
    370                 375                 380

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
385                 390                 395                 400

Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala
                405                 410                 415

Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495
```

```
Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Arg
            500                 505                 510

Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg
        515                 520                 525

Thr His Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    530                 535                 540

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
545                 550                 555                 560

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser
                565                 570                 575

Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            580                 585                 590

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        595                 600                 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    610                 615                 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
625                 630                 635                 640

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                645                 650                 655

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
            660                 665                 670

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
        675                 680                 685
```

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

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
705 710 715 720

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
725 730 735

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
740 745

<210> 107
<211> 750
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 107

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

```
Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Val Ile Thr Trp Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Lys His Gln
                245                 250                 255

Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285
```

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
305                 310                 315                 320

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
                325                 330                 335

Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
            340                 345                 350

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr
        355                 360                 365

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
    370                 375                 380

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala
                405                 410                 415

Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
```

485 490 495

Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
500 505 510

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg
515 520 525

Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
530 535 540

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
545 550 555 560

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser
565 570 575

Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
580 585 590

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
595 600 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
645 650 655

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
660 665 670

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
675 680 685

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

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
705 710 715 720

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
725 730 735

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
740 745 750

<210> 108
<211> 690
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 108

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

```
                85                  90                  95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
    130                 135                 140

Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
145                 150                 155                 160

Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly Trp Phe
                165                 170                 175

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Val Ile Thr Trp
            180                 185                 190

Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
        195                 200                 205

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
    210                 215                 220

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Lys His
225                 230                 235                 240

Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
                245                 250                 255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
        275                 280                 285
```

```
Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
    290                 295                 300

Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr
                325                 330                 335

His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
            340                 345                 350

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
        355                 360                 365

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu
    370                 375                 380

Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
385                 390                 395                 400

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
                405                 410                 415

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
            420                 425                 430

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        435                 440                 445

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg
    450                 455                 460

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser
465                 470                 475                 480
```

```
Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                485                 490                 495

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            500                 505                 510

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp
        515                 520                 525

Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp
    530                 535                 540

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
545                 550                 555                 560

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
                565                 570                 575

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
            580                 585                 590

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
        595                 600                 605

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
    610                 615                 620

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

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
                645                 650                 655

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile
            660                 665                 670
```

Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
675 680 685

Ser Ala
690

<210> 109
<211> 646
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 109

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
    130                 135                 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
145                 150                 155                 160

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
                165                 170                 175

Ala Val Ile Thr Trp Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
            180                 185                 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
        195                 200                 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
                245                 250                 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
        275                 280                 285

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
305                 310                 315                 320
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
                325                 330                 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
            340                 345                 350

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
        355                 360                 365

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
385                 390                 395                 400

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
                405                 410                 415

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln
            420                 425                 430

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly
        435                 440                 445

Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    450                 455                 460

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
465                 470                 475                 480

Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp
                485                 490                 495

Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly
            500                 505                 510

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
```

515 520 525

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
530 535 540

Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
545 550 555 560

Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
565 570 575

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
580 585 590

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
595 600 605

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
610 615 620

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
625 630 635 640

Val Thr Val Ser Ser Ala
645

<210> 110
<211> 433
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 110

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

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
```

```
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp
                245                 250                 255

Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp
            260                 265                 270

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
305                 310                 315                 320

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
                325                 330                 335

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
            340                 345                 350

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
        355                 360                 365

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    370                 375                 380

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
385                 390                 395                 400

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
                405                 410                 415
```

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425 430

Ala

<210> 111
<211> 403
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 111

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

```
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
    130                 135                 140

Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
145                 150                 155                 160

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe
                165                 170                 175

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu
            180                 185                 190

Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
        195                 200                 205

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
    210                 215                 220

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu
225                 230                 235                 240

Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr
                245                 250                 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
        275                 280                 285

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser
    290                 295                 300

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
305                 310                 315                 320
```

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
325 330 335

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
340 345 350

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
355 360 365

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr
370 375 380

Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
385 390 395 400

Ser Ser Ala

<210> 112
<211> 381
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 112

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

Ala Val Ile Thr Trp Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
130 135 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
145 150 155 160

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
165 170 175

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
180 185 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
195 200 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
225 230 235 240

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
        275                 280                 285

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln
    290                 295                 300

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly
305                 310                 315                 320

Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
            340                 345                 350

Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser
        355                 360                 365

Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
    370                 375                 380
```

<210> 113
<211> 750
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 113

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
```

20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
165 170 175

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly Trp Phe Arg
180 185 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Val Ile Thr Val Ser
195 200 205

Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
210 215 220

```
Ser Arg Asp Pro Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Lys His Gln
                245                 250                 255

Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
305                 310                 315                 320

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
                325                 330                 335

Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
            340                 345                 350

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr
        355                 360                 365

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
    370                 375                 380

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala
                405                 410                 415
```

```
Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg
        515                 520                 525

Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    530                 535                 540

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
545                 550                 555                 560

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser
                565                 570                 575

Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            580                 585                 590

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        595                 600                 605
```

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
645 650 655

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
660 665 670

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
675 680 685

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

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
705 710 715 720

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
725 730 735

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
740 745 750

<210> 114
<211> 646
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 114

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

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
    130                 135                 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
145                 150                 155                 160

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
                165                 170                 175

Ala Val Ile Thr Val Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
            180                 185                 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Pro Ser Lys Asn Thr Val Tyr
        195                 200                 205
```

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
                245                 250                 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
        275                 280                 285

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
305                 310                 315                 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
                325                 330                 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
            340                 345                 350

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
        355                 360                 365

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
385                 390                 395                 400

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
```

405 410 415

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln
420 425 430

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly
435 440 445

Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
450 455 460

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
465 470 475 480

Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp
485 490 495

Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly
500 505 510

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
515 520 525

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
530 535 540

Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
545 550 555 560

Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
565 570 575

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
580 585 590

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
595 600 605

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
610 615 620

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
625 630 635 640

Val Thr Val Ser Ser Ala
645

<210> 115
<211> 433
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

```
           100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp
                245                 250                 255

Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp
            260                 265                 270

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
```

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
305 310 315 320

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
325 330 335

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
340 345 350

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
355 360 365

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
370 375 380

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
385 390 395 400

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
405 410 415

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425 430

Ala

<210> 116
<211> 381
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 116

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

```
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
    130                 135                 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
                165                 170                 175

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
            180                 185                 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
        195                 200                 205
```

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
225                 230                 235                 240

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
        275                 280                 285

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln
    290                 295                 300

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly
305                 310                 315                 320

Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
            340                 345                 350

Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser
        355                 360                 365

Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
    370                 375                 380


<210>  117
<211>  750
<212>  PRT
```

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 117

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
165 170 175

```
Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Val Ile Thr Val Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Gln Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Lys His Gln
                245                 250                 255

Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
305                 310                 315                 320

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
                325                 330                 335

Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
            340                 345                 350

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr
        355                 360                 365
```

```
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
    370                 375                 380

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala
                405                 410                 415

Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg
        515                 520                 525

Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    530                 535                 540

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
545                 550                 555                 560
```

```
Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser
                565                 570                 575

Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            580                 585                 590

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        595                 600                 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    610                 615                 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
625                 630                 635                 640

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                645                 650                 655

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
            660                 665                 670

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
        675                 680                 685

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

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
705                 710                 715                 720

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
                725                 730                 735

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
            740                 745                 750
```

<210> 118

<211> 646
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 118

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
130 135 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
145 150 155 160

```
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
                165                 170                 175

Ala Val Ile Thr Val Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
            180                 185                 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gln Ser Lys Asn Thr Val Tyr
        195                 200                 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
                245                 250                 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
        275                 280                 285

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
305                 310                 315                 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
                325                 330                 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
            340                 345                 350

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
```

```
        355                 360                 365

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
385                 390                 395                 400

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
                405                 410                 415

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln
            420                 425                 430

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly
        435                 440                 445

Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    450                 455                 460

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
465                 470                 475                 480

Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp
                485                 490                 495

Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly
            500                 505                 510

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        515                 520                 525

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
    530                 535                 540

Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
545                 550                 555                 560
```

Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
565 570 575

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
580 585 590

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
595 600 605

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
610 615 620

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
625 630 635 640

Val Thr Val Ser Ser Ala
645

<210> 119
<211> 433
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 119

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

Ala Val Ile Thr Val Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```
    50                  55                  60

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp
                245                 250                 255
```

```
Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp
            260                 265                 270

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
305                 310                 315                 320

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
                325                 330                 335

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
            340                 345                 350

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
        355                 360                 365

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    370                 375                 380

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
385                 390                 395                 400

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
                405                 410                 415

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            420                 425                 430

Ala
```

<210> 120
<211> 381
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 120

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
130 135 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
145 150 155 160

```
Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
                165                 170                 175

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
            180                 185                 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
        195                 200                 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
225                 230                 235                 240

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
        275                 280                 285

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln
    290                 295                 300

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly
305                 310                 315                 320

Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
            340                 345                 350
```

Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser
355 360 365

Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
370 375 380

<210> 121
<211> 750
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 121

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

```
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Val Ile Thr Val Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Lys His Gln
                245                 250                 255

Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
305                 310                 315                 320
```

```
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
                325                 330                 335

Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
            340                 345                 350

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr
        355                 360                 365

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
    370                 375                 380

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala
                405                 410                 415

Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510
```

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg
515 520 525

Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
530 535 540

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
545 550 555 560

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser
565 570 575

Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
580 585 590

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
595 600 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
645 650 655

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
660 665 670

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
675 680 685

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

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

705 710 715 720

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
725 730 735

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
740 745 750

<210> 122
<211> 646
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

```
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
    130                 135                 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
145                 150                 155                 160

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
                165                 170                 175

Ala Val Ile Thr Val Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
            180                 185                 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
        195                 200                 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
                245                 250                 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
        275                 280                 285

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
```

```
305                 310                 315                 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
                325                 330                 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
            340                 345                 350

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
        355                 360                 365

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
385                 390                 395                 400

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
                405                 410                 415

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln
            420                 425                 430

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly
        435                 440                 445

Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    450                 455                 460

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
465                 470                 475                 480

Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp
                485                 490                 495

Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly
            500                 505                 510
```

```
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        515                 520                 525

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
    530                 535                 540

Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
545                 550                 555                 560

Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
                565                 570                 575

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
            580                 585                 590

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
        595                 600                 605

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
    610                 615                 620

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
625                 630                 635                 640

Val Thr Val Ser Ser Ala
                645
```

<210> 123
<211> 433
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 123

```
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
```

```
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser
        195                 200                 205
```

```
Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp
                245                 250                 255

Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp
            260                 265                 270

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
305                 310                 315                 320

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
                325                 330                 335

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
            340                 345                 350

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
        355                 360                 365

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    370                 375                 380

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
385                 390                 395                 400
```

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
405 410 415

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425 430

Ala

<210> 124
<211> 381
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 124

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

```
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
    130                 135                 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
                165                 170                 175

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
            180                 185                 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
        195                 200                 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
225                 230                 235                 240

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
        275                 280                 285

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln
    290                 295                 300
```

```
Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly
305                 310                 315                 320

Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
            340                 345                 350

Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser
        355                 360                 365

Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
    370                 375                 380
```

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

<220>
<223> Thành phần liên kết 9GS

<400> 125

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1               5
```

<210> 126
<211> 423
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 126

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

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His Ala Met Gly Trp Phe Arg
            180                 185                 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Val Ile Thr Trp Ser
        195                 200                 205

Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
```

```
    210                 215                 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
225                 230                 235                 240

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Lys His Gln
                245                 250                 255

Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
305                 310                 315                 320

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
                325                 330                 335

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
            340                 345                 350

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
        355                 360                 365

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
    370                 375                 380

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
385                 390                 395                 400

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
                405                 410                 415
```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420

<210> 127
<211> 441
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 127

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

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

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Arg Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
100 105 110

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
165 170 175

Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
180 185 190

Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Arg Gly Asn Glu Arg
195 200 205

Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala
210 215 220

Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
225 230 235 240

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
245 250 255

Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro
260 265 270

Ile Lys Ala Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
275 280 285

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
290 295 300

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
305 310 315 320

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
325 330 335

```
Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
            340                 345                 350

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
        355                 360                 365

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
    370                 375                 380

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
385                 390                 395                 400

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
                405                 410                 415

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
            420                 425                 430

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        435                 440
```

<210> 128
<211> 162
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 128

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

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

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Arg Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val
```

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
100 105 110

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp
130 135 140

Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ala Ala His His His His
145 150 155 160

His His

<210> 129
<211> 137
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 129

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Arg Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
100 105 110

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala His His His His His His
130 135

<210> 130
<211> 162
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 130

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Glu Ser Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Leu Leu Trp Trp Thr Ser Glu Tyr Ala Pro Ile Lys Ala
100 105 110

Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp
130 135 140

Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ala Ala His His His His
145 150 155 160

His His

<210> 131
<211> 153
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 131

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp
115 120 125

Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
130 135 140

Gly Ala Ala His His His His His His
145 150

<210> 132
<211> 153
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 132

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp
115 120 125

Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
130 135 140

Gly Ala Ala His His His His His His
145 150

<210> 133
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 133

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His
115 120 125

<210> 134
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 134

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His His His His His
115 120 125

<210> 135
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 135

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

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

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His His His His His
115 120 125

<210> 136
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Lama được làm giống người

<400> 136

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ala Ser Ile His
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Asp Lys His Gln Ser Ser Phe Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His His His His His
115 120 125

<210> 137
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

```
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
    130                 135                 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145                 150                 155                 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
                165                 170                 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
            180                 185                 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
        195                 200                 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
    210                 215                 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225                 230                 235                 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
                245                 250                 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
            260                 265                 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
        275                 280                 285
```

<210> 138
<211> 525
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

```
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
```

1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
195 200 205

```
Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
    210                 215                 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225                 230                 235                 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
                245                 250                 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
            260                 265                 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
        275                 280                 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
    290                 295                 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
305                 310                 315                 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
                325                 330                 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
            340                 345                 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
        355                 360                 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
    370                 375                 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
385                 390                 395                 400
```

```
Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
                405                 410                 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
            420                 425                 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
        435                 440                 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
    450                 455                 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
465                 470                 475                 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
                485                 490                 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
            500                 505                 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
        515                 520                 525
```