(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) **1-0039331**

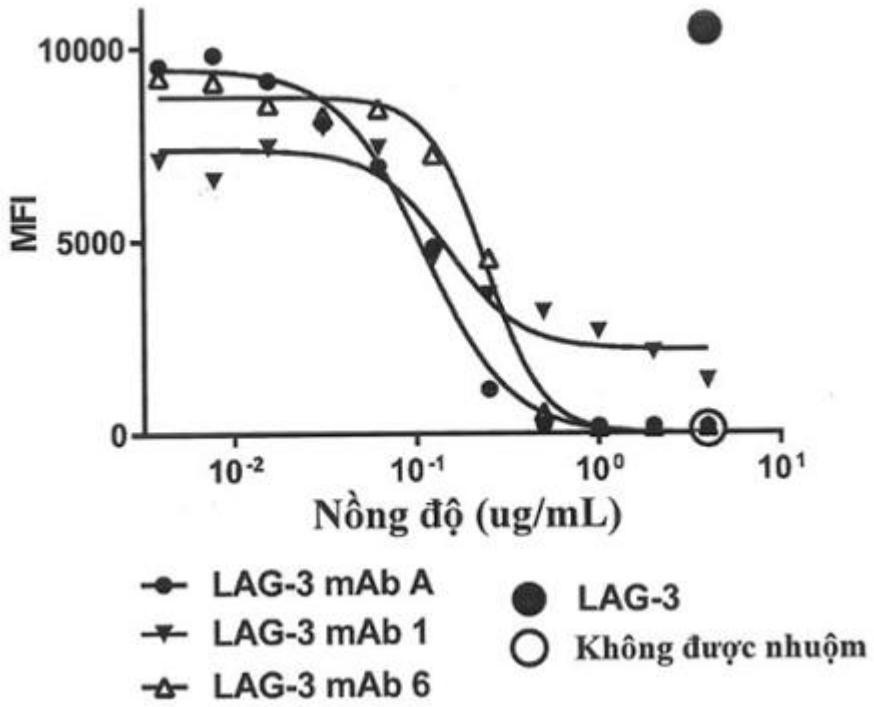
(51)[7] **C07K 16/28**; A61P 39/00; A61K 47/68; A61P 31/04

(13) **B**

(21) 1-2017-05089 (22) 07/06/2016
(86) PCT/US2016/036172 07/06/2016 (87) WO 2016/200782 15/12/2016
(30) 62/172,277 08/06/2015 US; 62/255,094 13/11/2015 US
(45) 25/04/2024 433 (43) 26/11/2018 368A
(73) MACROGENICS, INC. (US)
9704 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America
(72) LA MOTTE-MOHS, Ross (US); SHAH, Kalpana (US); SMITH, Douglas, H. (US); JOHNSON, Lesile, S. (US); MOORE, Paul, A. (GB); BONVINI, Ezio (US); KOENIG, Scott (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHÂN TỬ LIÊN KẾT GEN HOẠT HÓA TẾ BÀO LYMPHO 3 (LAG-3) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG-3, LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, và LAG-3 mAb 6, và các phiên bản được làm giống như của người và thể khảm của các kháng thể này. Sáng chế còn đề cập đến các phân tử liên kết LAG-3 mà bao gồm các mảnh liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 này, các thể tiếp hợp miễn dịch, và các phân tử đặc hiệu kép, bao gồm các kháng tổ hợp kép, BiTE, các kháng thể đặc hiệu kép, *v.v.,* mà bao gồm (i) các mảnh liên kết LAG-3 này, và (ii) miền có khả năng liên kết với epitop của phân tử liên quan đến việc điều hòa điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của các tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa phân tử liên kết này.


10000
5000
0
MFI
$10^{-2}$
$10^{-1}$
$10^{0}$
$10^{1}$
Nồng độ (ug/mL)
LAG-3 mAb A
LAG-3 mAb 1
LAG-3 mAb 6
LAG-3
Không được nhuộm

**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến phân tử liên kết LAG-3 bao gồm miền liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 được lựa chọn: LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 có khả năng liên kết với cả LAG-3 ở khỉ đầu chó và LAG-3 ở người. Cụ thể, sáng chế liên quan đến các phân tử liên kết LAG-3 được làm giống như của người hoặc các phiên bản thể khảm của các kháng thể này, hoặc bao gồm các mảnh liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 này (đặc biệt là các thể tiếp hợp miễn dịch, các kháng thể tổ hợp kép, BiTE, các kháng thể đặc hiệu kép, *v.v.*). Cụ thể, sáng chế liên quan đến các phân tử liên kết LAG-3 như vậy mà còn có khả năng liên kết epitop của phân tử liên quan đến sự điều hòa điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sử dụng các phân tử liên kết LAG-3 này để phát hiện LAG-3 hoặc để kích thích đáp ứng miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp trị liệu kết hợp trong đó phân tử liên kết LAG-3 mà bao gồm một hoặc nhiều miền liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 được lựa chọn này được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều phân tử bổ sung có hiệu quả trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch để nhờ đó tăng cường, kích thích hoặc điều hòa tăng hơn nữa đáp ứng miễn dịch như vậy ở đối tượng.

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

I. Các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào

Hệ miễn dịch của người và các loài động vật có vú khác chịu trách nhiệm cung cấp sự bảo vệ chống lại các bệnh và lây nhiễm. Sự bảo vệ như vậy được tạo ra bởi đáp ứng miễn dịch thể dịch và bởi đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Đáp ứng thể dịch dẫn đến việc sản sinh kháng thể và các phân tử sinh học khác mà có khả năng nhận diện và trung hòa các đích ngoại lai (kháng nguyên). Ngược lại, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào liên quan đến sự hoạt hóa của các đại thực bào, tế

bào giết tự nhiên (NK), và tế bào lympho T gây độc tế bào đặc hiệu kháng nguyên bởi các tế bào T, và sự giải phóng các xytokin khác nhau đáp ứng lại sự nhận diện kháng nguyên (Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*", Immunolog. Res. 28(1):39-48).

Khả năng của các tế bào T trong việc điều tiết một cách tối ưu đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên cần đến hai tương tác truyền tín hiệu riêng biệt (Viglietta, V. *et al.* (2007) "*Modulating Co-Stimulation*", Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. *et al.* (2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*", Adv. Immunol. 90:297-339). Thứ nhất, kháng nguyên đã được sắp hàng trên bề mặt của các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) phải được trình diện với tế bào T $CD4^+$ chưa qua thử nghiệm đặc hiệu kháng nguyên. Việc trình diện này phát tín hiệu thông qua thụ thể tế bào T (TCR) mà điều khiển tế bào T khởi đầu đáp ứng miễn dịch sẽ là đặc hiệu với kháng nguyên được trình diện. Thứ hai, một loạt các tín hiệu đồng kích thích và ức chế, được điều tiết thông qua các tương tác giữa APC và các phân tử bề mặt tế bào T riêng biệt, kích hoạt đầu tiên là sự hoạt hóa và tăng sinh của các tế bào T và cuối cùng là sự ức chế của chúng. Theo đó, tín hiệu đầu tiên truyền tính đặc hiệu cho đáp ứng miễn dịch còn tín hiệu thứ hai nhằm xác định bản chất, biên độ và khoảng thời gian của đáp ứng đó.

Hệ miễn dịch được kiểm soát chặt chẽ bởi các phối tử và thụ thể đồng ức chế và đồng kích thích. Các phân tử này cung cấp tín hiệu thứ hai để hoạt hóa tế bào T và tạo ra mạng lưới cân bằng giữa các tín hiệu dương và âm để tối đa hóa các đáp ứng miễn dịch chống lại sự lây nhiễm trong khi giới hạn tính miễn dịch ở bản thân phân tử đó (Wang, L. *et al.* (2011) "*VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses*", J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. *et al.* (2008) "*The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections*", Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). Con đường ức chế chủ yếu đối với việc duy trì sự tự dung nạp và điều biến khoảng thời gian và biên độ của đáp ứng miễn dịch được đề cập chung là điểm kiểm tra miễn dịch. Đặc biệt quan trọng là liên kết giữa các phối tử B7.1 (CD80) và B7.2 (CD86) của tế bào trình diện kháng nguyên và các thụ thể CD28 và CTLA-4 của tế bào lympho T $CD4^+$ (Sharpe, A.H. *et al.* (2002)

"*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*", Immunol. Rev. 229:307-321). Liên kết của B7.1 hoặc của B7.2 với CD28 kích thích sự hoạt hóa tế bào T; liên kết của B7.1 hoặc B7.2 với CTLA-4 ức chế sự hoạt hóa này (Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*", Immunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. *et al.* (2005) "*The B7 Family Revisited*", Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). CD28 được biểu hiện chủ yếu trên bề mặt của tế bào T (Gross, J., *et al.* (1992) "*Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse*", J. Immunol. 149:380–388), trong khi đó sự biểu hiện CTLA-4 được điều hòa tăng một cách nhanh chóng sau khi hoạt hóa tế bào T (Linsley, P. *et al.* (1996) "*Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement*", Immunity 4:535–543). Do CTLA-4 là thụ thể có ái lực cao hơn (Sharpe, A.H. *et al.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126), nên đầu tiên thì liên kết này khởi đầu sự tăng sinh của tế bào T (thông qua CD28) và sau đó ức chế nó (thông qua sự biểu hiện mới sinh của CTLA-4), nhờ đó không cần thiết phải tăng cường hiệu quả khi tăng sinh nữa.

Các nghiên cứu khác về các phối tử của thụ thể CD28 đã giúp nhận biết và mô tả đặc điểm của một nhóm các phân tử B7 có liên quan ("Siêu họ B7") (Sharpe, A.H. *et al.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Greenwald, R.J. *et al.* (2005) "*The B7 Family Revisited*", Ann. Rev. Immunol. 23:515-548; Collins, M. *et al.* (2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*", Genome Biol. 6:223.1-223.7; Loke, P. *et al.* (2004) "*Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells*". Arthritis Res. Ther. 6:208-214; Korman, A.J. *et al.* (2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*", Adv. Immunol. 90:297-339; Flies, D.B. *et al.* (2007) "*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*", J. Immunother. 30(3):251-260; Agarwal, A. *et al.* (2008) "*The Role Of Positive Costimulatory*

*Molecules In Transplantation And Tolerance*", Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372; Wang, S. *et al.* (2004) "*Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses*", Microbes Infect. 6:759-766). Hiện tại, có một vài thành viên đã biết thuộc họ này: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), phối tử đồng kích thích có thể cảm ứng (ICOS-L), phối tử chết theo chương trình-1 (PD-L1; B7-H1), phối tử chết theo chương trình-2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 và B7-H6 (Collins, M. *et al.* (2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*", Genome Biol. 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. *et al.* (2012) "*Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC*", Immunogenetics 64(8):571-90).

II. Gen hoạt hóa tế bào lympho-3 ("LAG-3")

Gen hoạt hóa tế bào lympho 3 mã hóa protein thụ thể bề mặt tế bào được đề cập đến là "LAG-3", hoặc CD223 (Triebel, F. *et al.* (1990) "*LAG-3, A Novel Lymphocyte Activation Gene Closely Related To CD4*", J. Exp. Med. 171(5):1393-1405). LAG-3 được biểu hiện bằng các tế bào T CD4+ và CD8+ đã được hoạt hóa và bằng các tế bào NK, và chủ yếu được biểu hiện bởi các tế bào đuôi gai dạng tương bào. LAG-3 không được biểu hiện bởi các tế bào B, bạch cầu đơn nhân hoặc các loại tế bào bất kỳ khác được thử nghiệm (Workman, C.J. *et al.* (2009) "*LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis*", J. Immunol. 182(4):1885-1891).

LAG-3 được phát hiện là có mối liên hệ chặt chẽ với CD4 đồng thụ thể tế bào T (Triebel, F. *et al.* (1990) "*LAG-3, A Novel Lymphocyte Activation Gene Closely Related To CD4*", J. Exp. Med. 171(5):1393-1405; Grosso, J.F. *et al.* (2009) "*Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells*", J. Immunol. 182(11):6659-6669; Huang, C.T. *et al.* (2004) "*Role Of LAG-3 In Regulatory T-Cells*", Immunity 21:503-513; Workman, C.J. *et al.* (2009) "*LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis*", J. Immunol. 182(4):1885-1891). Tương tự CD4, LAG-3 cũng liên kết với các phân tử MHC lớp II nhưng các phân tử này liên kết với ái lực cao hơn đáng kể (Workman, C.J. *et al.* (2002) "*Phenotypic Analysis Of The Murine CD4-Related Glycoprotein,*

*CD223 (LAG-3)*", Eur. J. Immunol. 32:2255-2263; Huard, B. *et al.* (1995) "*CD4/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Analyzed With CD4-And Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)-Ig Fusion Proteins*", Eur. J. Immunol. 25:2718-2721; Huard, B. *et al.* (1994) "*Cellular Expression And Tissue Distribution Of The Human LAG-3- Encoded Protein, An MHC Class II Ligand*", Immunogenetics 39:213-217).

Các nghiên cứu chỉ ra rằng LAG-3 đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa âm sự tăng sinh, chức năng và sự nội cân bằng của tế bào T (Workman, C.J. *et al.* (2009) "*LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis*", J. Immunol. 182(4):1885-1891; Workman, C.J. *et al.* (2002) "*Cutting Edge: Molecular Analysis Of The Negative Regulatory Function Of Lymphocyte Activation Gene-3*", J. Immunol. 169:5392-5395; Workman, C.J. *et al.* (2003) "T*he CD4-Related Molecule, LAG-3 (CD223), Regulates The Expansion Of Activated T-Cells*", Eur. J. Immunol. 33:970-979; Workman, C.J. (2005) "*Negative Regulation Of T-Cell Homeostasis By Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223)*", J. Immunol. 174:688-695; Hannier, S. *et al.* (1998) "*CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling*", J. Immunol. 161:4058-4065; Huard, B. *et al.* (1994) "*Lymphocyte-Activation Gene 3/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Modulates The Antigenic Response Of CD4+ T Lymphocytes*", Eur. J. Immunol. 24:3216-3221).

Các nghiên cứu đã gợi ý rằng việc ức chế chức năng LAG-3 thông qua sự phong bế kháng thể có thể đảo ngược sự ức chế hệ miễn dịch qua trung gian LAG-3 và khôi phục phần nào chức năng tác động (Grosso, J.F. *et al.* (2009) "*Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells*", J. Immunol. 182(11):6659-6669; Grosso, J.F. *et al.* (2007) "*LAG-3 Regulates CD8+ T-Cell Accumulation And Effector Function During Self And Tumor Tolerance*", J. Clin. Invest. 117:3383-3392). LAG-3 đã được phát hiện ra là điều hòa âm sự lan rộng tế bào T thông qua sự ức chế của các dòng canxi cảm ứng bởi TCR, và kiểm soát kích thước của vùng chứa tế bào T ghi nhớ (Matsuzaki, J. *et al.* (2010) "*Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8+ T-Cells Are Negatively Regulated By LAG-3 and PD-1 In Human Ovarian Cancer*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)

107(17):7875-7880; Workman C.J., *et al.* (2004) "*Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates The Size Of The Expanding T-Cell Population Following Antigen Activation in vivo*", J. Immunol. 172:5450-5455).

Tuy nhiên, bất kể tất cả các cải tiến trước đó, vẫn cần phải có các chế phẩm cải thiện có khả năng định hướng mạnh mẽ hơn hệ miễn dịch của cơ thể để tấn công các tế bào ung thư hoặc các tế bào bị lây nhiễm nguồn gây bệnh, đặc biệt là ở các nồng độ điều trị bệnh thấp hơn. Dù hệ miễn dịch thích nghi có thể là cơ chế phòng vệ tiềm năng chống lại bệnh và bệnh ung thư, nhưng nó thường bị cản trở bởi các cơ chế ức chế miễn dịch trong vi môi trường khối u, như sự biểu hiện của LAG-3. Hơn nữa, các phân tử đồng ức chế được biểu hiện bởi các tế bào khối u, tế bào miễn dịch, và tế bào nền trong môi trường khối u có thể giảm độc lực một cách đáng kể các đáp ứng của tế bào T chống lại các tế bào ung thư. Do đó, cần có các phân tử liên kết LAG-3 có hoạt lực. Cụ thể, cần có các phân tử liên kết LAG-3 mà profin động học liên kết mong muốn, liên kết các epitop LAG-3 khác nhau và/hoặc thể hiện hoạt tính chất đơn mà có thể đem đến tác dụng điều trị bệnh tốt hơn cho các bệnh nhân mắc bệnh ung thư hoặc các bệnh và tình trạng bệnh lý khác. Sáng chế đề cập đến các mục đích này và các mục đích khác.

**Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất các phân tử liên kết LAG-3 bao gồm miền liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 được lựa chọn: LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 có khả năng liên kết với cả LAG-3 ở khỉ đầu chó và LAG-3 ở người. Cụ thể, sáng chế đề xuất các phân tử liên kết LAG-3 được làm giống như của người hoặc các phiên bản thể khảm của các kháng thể này, hoặc bao gồm các mảnh liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 như vậy (đặc biệt là các thể tiếp hợp miễn dịch, các kháng thể tổ hợp kép, BiTE, các kháng thể đặc hiệu kép, *v.v.*). Cụ thể, sáng chế đề xuất các phân tử liên kết LAG-3 như vậy mà còn có khả năng liên kết epitop của phân tử liên quan đến việc điều hòa điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng các phân tử liên kết LAG-3 này để phát hiện LAG-3 hoặc để kích thích đáp ứng miễn dịch. Sáng chế cũng đề xuất phương

pháp trị liệu kết hợp trong đó phân tử liên kết LAG-3 mà bao gồm một hoặc nhiều miền liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 được lựa chọn này được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều các phân tử bổ sung mà có hiệu quả trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch để từ đó tăng cường, kích thích hoặc điều hòa tăng hơn nữa đáp ứng miễn dịch này ở đối tượng.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử liên kết LAG-3 có khả năng liên kết với cả LAG-3 ở người và LAG-3 ở khỉ đầu chó, trong đó phân tử này bao gồm ba miền CDR chuỗi nặng, $CDR_H1$, $CDR_H2$ và $CDR_H3$, và ba miền CDR chuỗi nhẹ, $CDR_L1$, $CDR_L2$, và $CDR_L3$, trong đó:

(A) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 1, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 1, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, và SEQ ID NO:15;

hoặc

(B) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của hLAG-3 mAb 1, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của hLAG-3 mAb 1, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:14, và SEQ ID NO:15;

hoặc

(C) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 2, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, và SEQ ID NO:33; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 2, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, và SEQ ID NO:38;

hoặc

(D) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 3, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, và SEQ ID NO:43; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 3, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, và SEQ ID NO:48;

hoặc

(E) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 4, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, và SEQ ID NO:53; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 4, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, và SEQ ID NO:58;

hoặc

(F) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 5, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, và SEQ ID NO:63; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 5, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, và SEQ ID NO:68;

hoặc

(G) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 6 VH1, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, và SEQ ID NO:73; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 6, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, và SEQ ID NO:78;

hoặc

(H) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 hAb 6, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, và SEQ ID NO:73; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của hLAG-3 hAb 6, và lần lượt có các trình tự axit amin: SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:77, và SEQ ID NO:78.

Sáng chế còn đề xuất các phương án về các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:49, hoặc SEQ ID NO:59.

Sáng chế còn đề xuất các phương án về các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:54, hoặc SEQ ID NO:64.

Sáng chế còn đề xuất các phương án về các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:79, hoặc SEQ ID NO:80.

Sáng chế còn đề xuất các phương án về các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:83, hoặc SEQ ID NO:85.

Sáng chế còn đề xuất các phương án về tất cả các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó phân tử này là kháng thể, và đặc biệt là trong đó phân tử này là kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người.

Sáng chế còn đề xuất phương án, trong đó phân tử liên kết LAG-3 là phân tử liên kết đặc hiệu kép, có khả năng liên kết đồng thời với LAG-3 ở người và với epitop thứ hai, và cụ thể là đề xuất phương án trong đó epitop thứ hai là epitop của phân tử liên quan đến việc điều hòa điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của tế bào miễn dịch (đặc biệt là trong đó epitop thứ hai là epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC lớp I hoặc II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1,

PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 hoặc VISTA, và đặc biệt nhất là trong đó epitop thứ hai là epitop của CD137, OX40, PD-1, TIGIT hoặc TIM-3).

Sáng chế còn đề xuất phương án về các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó phân tử này là kháng tổ hợp kép, và đặc biệt là, trong đó kháng tổ hợp kép này là phức hợp được liên kết cộng hóa trị bao gồm hai, hoặc ba, hoặc bốn, hoặc năm, hoặc nhiều hơn năm chuỗi polypeptit. Sáng chế còn đề xuất phương án về các phân tử liên kết kháng LAG-3, trong đó phân tử này là phân tử liên kết ba giá, phân tử liên kết ba giá này là phức hợp được liên kết cộng hóa trị bao gồm ba, bốn, năm hoặc nhiều hơn năm chuỗi polypeptit. Sáng chế còn đề xuất phương án về các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc. Sáng chế còn đề xuất phương án về các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó phân tử này bao gồm miền liên kết albumin, và đặc biệt là miền liên kết albumin được loại miễn dịch.

Sáng chế còn đề xuất các phương án về tất cả các phân tử liên kết LAG-3 như vậy, trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc (Phân đoạn có thể kết tinh), và trong đó vùng Fc này là một vùng Fc biến thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin mà làm giảm ái lực của vùng Fc biến thể này đối với FcγR và/hoặc tăng cường thời gian bán thải trong huyết thanh, và cụ thể hơn, trong đó các cải biến này bao gồm ít nhất một đoạn thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) L234A;

(2) L235A;

(3) L234A và L235A;

(4) M252Y; M252Y và S254T;

(5) M252Y và T256E;

(6) M252Y, S254T và T256E; hoặc

(7) K288D và H435K;

trong đó việc đánh số là đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

Sáng chế còn đề xuất các phương án trong đó phân tử bất kỳ trong số các phân tử liên kết LAG-3 đã mô tả ở trên được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T. Sáng chế cũng đề xuất các phương án trong đó phân tử bất kỳ trong số các phân tử liên kết LAG-3 đã mô tả ở trên được sử dụng trong điều trị bệnh

hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến hệ miễn dịch bị ức chế, đặc biệt là bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm.

Sáng chế đặc biệt đề xuất phương pháp sử dụng như vậy trong điều trị hoặc chẩn đoán hoặc tiên lượng bệnh ung thư, trong đó bệnh ung thư này được đặc trưng bởi sự có mặt của tế bào ung thư được chọn từ nhóm bao gồm tế bào của: u tuyến thượng thận, bệnh ung thư có liên quan đến AIDS, sacôm nang mô mềm, u tế bào hình sao, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tủy sống, u não di căn, bệnh ung thư vú, u thể cảnh, bệnh ung thư cổ, sacôm sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào sáng, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư đại trực tràng, u mô bào sợi trên da lành tính, u tế bào nhỏ tròn tạo mô xơ, u màng não thất, khối u Ewing, sacôm sụn dạng niêm dịch ngoài khung xương, bệnh xương dễ gãy tạo sụn, bệnh loạn sản xơ xương, bệnh ung thư túi mật hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh nguyên bào nuôi thai kỳ, u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư tế bào tiểu đảo, sacôm Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, u mỡ/khối u mỡ lành tính, sacôm mỡ/khối u mỡ ác tính, bệnh ung thư gan, u lympho, bệnh ung thư phổi, u nguyên tủy bào, u hắc sắc tố, u màng não, đa u tuyến nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, u tuyến cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, u vỏ thần kinh ngoại vi, u tủy thượng thận, u tuyến yên, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u hắc sắc tố sau màng mạch nho, rối loạn máu hiếm, bệnh ung thư thận di căn, khối u hình gậy, sacôm cơ vân, sacôm, bệnh ung thư da, sacôm mô mềm, bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư dạ dày, sacôm hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, bệnh ung thư di căn tuyến giáp, và bệnh ung thư tử cung.

Sáng chế đặc biệt đề xuất phương pháp sử dụng như vậy trong điều trị hoặc chẩn đoán hoặc tiên lượng bệnh ung thư, trong đó bệnh ung thư này là bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom tế bào gan, u thần kinh đệm, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư vú, đa u tủy, bệnh ung thư bàng quang, u nguyên bào thần kinh; sacôm, u lympho không phải Hodgkin, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh bạch cầu nguyên

bào cấp tính (AML), bệnh bạch cầu mạn tính do tủy xương tạo ra (CML), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho B cấp tính (B-ALL), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), u tế bào đuôi gai plasma mầm (BPDCN), u lympho không phải Hodgkin (NHL), bao gồm bệnh bạch cầu tế bào vỏ (MCL), và u lympho bạch huyết bào nhỏ (SLL), u lympho Hodgkin, u tế bào bón hệ thống, hoặc u lympho Burkitt.

Sáng chế còn đề xuất các phương án trong đó phân tử bất kỳ trong số các phân tử liên kết LAG-3 được mô tả ở trên được đánh dấu có thể phát hiện được và được sử dụng để phát hiện LAG-3.

**Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig. 1 mô tả sơ đồ của kháng tổ hợp kép được liên kết cộng hóa trị đại diện có hai vị trí liên kết epitop gồm hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có miền kích thích heterodime vòng xoắn E hoặc vòng xoắn K. Gốc xystein có thể có mặt trong tác nhân liên kết và/hoặc trong miền kích thích heterodime như được thể hiện trên Fig. 3B. Các miền VL và VH nhận diện cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Fig. 2 mô tả sơ đồ của phân tử kháng tổ hợp kép được liên kết cộng hóa trị đại diện có hai vị trí liên kết epitop gồm hai chuỗi polypeptit, mỗi vị trí có các miền CH2 và CH3, để cho các chuỗi liên kết này tạo ra toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc. Các miền VL và VH nhận diện cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Các hình vẽ từ Fig. 3A đến Fig. 3C mô tả các biểu đồ thể hiện các kháng tổ hợp kép bốn giá đại diện có bốn vị trí liên kết epitop gồm hai cặp chuỗi polypeptit (nghĩa là, tổng cộng bốn chuỗi polypeptit). Một chuỗi polypeptit trong mỗi cặp mang các miền CH2 và CH3, để cho các chuỗi liên kết tạo thành toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc. Các miền VL và VH nhận diện cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm. Hai cặp chuỗi polypeptit này có thể là giống nhau. Theo các phương án này, trong đó các miền VL và VH nhận diện các epitop khác nhau (như được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 3A đến Fig. 3C), phân

tử tạo thành mang bốn vị trí liên kết epitop và là đặc hiệu kép và hai giá đối với mỗi epitop đã liên kết. Theo các phương án này, trong đó các miền VL và VH nhận diện cùng một epitop (ví dụ, các CDR của miền VL tương tự và các CDR của miền VH tương tự được sử dụng trên cả hai chuỗi), phân tử tạo thành mang bốn vị trí liên kết epitop và đặc hiệu đơn và bốn giá đối với một epitop. Theo cách khác, hai cặp polypeptit có thể khác nhau. Theo các phương án này trong đó các miền VL và VH của mỗi cặp polypeptit nhận diện các epitop khác nhau (như được thể hiện trên Fig. 3C), phân tử tạo thành mang bốn vị trí liên kết epitop và là đặc hiệu bốn và đơn giá đối với mỗi epitop đã liên kết. Fig. 3A thể hiện kháng tổ hợp kép Fc mà chứa miền kích thích heterodime của peptit chứa gốc xystein. Fig. 3B thể hiện kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc, chứa các miền kích thích heterodime vòng xoắn E và vòng xoắn K chứa gốc xystein và tác nhân liên kết (với gốc xystein tùy ý). Fig. 3C, thể hiện kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc, chứa các miền CH1 và CL của kháng thể.

Các hình vẽ Fig. 4A và Fig. 4B mô tả các sơ đồ về phân tử kháng tổ hợp kép được liên kết cộng hóa trị đại diện có hai vị trí liên kết epitop gồm ba chuỗi polypeptit. Hai chuỗi polypeptit mang miền CH2 và CH3, để cho các chuỗi liên kết tạo thành toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc. Các chuỗi polypeptit bao gồm miền VL và VH còn bao gồm miền kích thích heterodime. Các miền VL và VH nhận diện cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Fig. 5 mô tả các sơ đồ về phân tử kháng tổ hợp kép được liên kết cộng hóa trị đại diện có bốn vị trí liên kết epitop gồm năm chuỗi polypeptit. Hai chuỗi polypeptit mang miền CH2 và CH3, để cho các chuỗi có liên quan tạo ra vùng Fc mà bao gồm toàn bộ hoặc một phần của miền Fc. Các chuỗi polypeptit bao gồm các miền VL và VH đã liên kết còn bao gồm miền kích thích heterodime. Các miền VL và VH nhận diện cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Các hình vẽ từ Fig. 6A đến Fig. 6F mô tả các sơ đồ về các phân tử liên kết ba giá chứa vùng Fc đại diện có ba vị trí liên kết epitop. Các hình vẽ Fig. 6A và Fig. 6B, một cách tương ứng, minh họa dưới dạng sơ đồ các miền của các phân tử liên kết ba giá bao gồm hai miền liên kết kiểu kháng tổ hợp kép và miền liên kết kiểu

Fab có các định hướng miền khác nhau trong đó các miền liên kết kiểu kháng tổ hợp kép là đầu tận N hoặc đầu tận C với vùng Fc. Các phân tử trên các hình vẽ Fig. 6A và Fig. 6B bao gồm bốn chuỗi. Các hình vẽ Fig. 6C và Fig. 6D, một cách tương ứng, minh họa dưới dạng sơ đồ các miền của các phân tử liên kết ba giá bao gồm hai miền liên kết kiểu kháng tổ hợp kép đầu tận N với vùng Fc, và miền liên kết kiểu Fab trong đó chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết thông qua vùng đệm liên kết polypeptit, hoặc miền liên kết kiểu scFv. Các phân tử liên kết ba giá trên các hình vẽ Fig. 6E và Fig. 6F, một cách tương ứng minh họa dưới dạng sơ đồ các miền của các phân tử liên kết ba giá bao gồm hai miền liên kết kiểu kháng tổ hợp kép đầu tận C với vùng Fc, và miền liên kết kiểu Fab được liên kết, hoặc miền liên kết kiểu scFv trong đó các miền liên kết kiểu kháng tổ hợp kép. Các phân tử liên kết ba giá trên các hình vẽ từ Fig. 6C đến Fig. 6F bao gồm ba chuỗi. Các miền VL và VH nhận diện cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Các hình vẽ từ Fig. 7A đến Fig. 7C thể hiện các đặc tính liên kết của LAG-3 mAb 1 và LAG-3 mAb 6 với LAG-3 ở khỉ đầu chó. Đường cong liên kết Biacore của hLAG-3 mAb 6 (1.1) (Fig. 7A), hLAG-3 mAb 1 (1.4) (Fig. 7B) và LAG-3 mAb A (Fig. 7C) chứng minh rằng hLAG-3 mAb 6 (1.1) thể hiện khả năng liên kết tốt hơn với LAG-3 ở khỉ đầu chó (RU; đơn vị đáp ứng).

Các hình vẽ từ Fig. 8A đến Fig. 8D cho thấy rằng LAG-3 mAb 1 và LAG-3 mAb 6 liên kết với epitop mà khác biệt với một epitop được liên kết bằng kháng thể tham chiếu LAG 3 mAb A. Các profin liên kết của LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 và LAG-3 mAb A được đánh dấu khi không có mặt kháng thể cạnh tranh (Fig. 8A), khi có mặt LAG-3 mAb 1 dư (Fig. 8B), LAG-3 mAb 6 dư (Fig. 8C), hoặc LAG-3 mAb A (Fig. 8D) (RU; đơn vị đáp ứng).

Các hình vẽ từ Fig. 9A đến Fig. 9B cho thấy rằng các kháng thể đã phân lập ức chế sự liên kết của LAG-3 người có thể hòa tan (shLAG-3) đối với MHC lớp II như được xác định trong thử nghiệm ELISA. Fig. 9A thể hiện đường cong ức chế của LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, và LAG-3 mAb 5. Fig. 9B thể hiện đường cong ức chế của LAG-3 mAb A, hLAG-3 1 được làm giống như của người (1.4), và hLAG-3 6 (1.1) (RLU; Đơn vị phát quang tương đối).

Các hình vẽ từ Fig. 10A đến Fig. 10C thể hiện các kháng thể đã phân lập ức chế sự liên kết của shLAG-3 đối với bề mặt của các tế bào Daudi biểu hiện MHC lớp II. Fig. 10A thể hiện đường cong ức chế của LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, và kháng thể tham chiếu LAG-3 mAb A. Fig. 10B thể hiện đường cong ức chế của LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 và LAG-3 mAb A. Fig. 10C thể hiện đường cong ức chế của LAG-3 mAb 1 và hLAG-3 1 được làm giống như của người (1.4), hLAG-3 1 (1.2), hLAG-3 1 (2.2), hLAG-3 1 (1.1). Mỗi Fig. thể hiện một thử nghiệm riêng biệt; MFI, có nghĩa là cường độ huỳnh quang.

Các hình vẽ từ Fig. 11A đến Fig. 11C cho thấy rằng sự biểu hiện của LAG-3 được điều hòa tăng trong các tế bào T CD4+ đã được kích thích. Phân tích đếm tế bào theo dòng về sự biểu hiện LAG-3 trên các tế bào T CD4+ không được kích thích (Fig. 11A) và các tế bào T CD4+ được kích thích bởi hạt CD3/CD28 từ hai đối tượng cho khác nhau (các hình vẽ Fig. 11B và Fig. 11C) vào ngày 11 và 14, một cách tương ứng. Tất cả các tế bào được nhuộm đồng thời bằng kháng thể kháng CD4.

Fig. 12 (các hình từ A đến F) cho thấy rằng các kháng thể kháng LAG-3 đã phân lập liên kết với các tế bào T được kích thích chứ không liên kết với các tế bào T không được kích thích. Phân tích đếm tế bào theo dòng của các tế bào T CD4+ được kích thích bởi CD3/CD28 (các hình từ A đến C) và các tế bào T CD4+ không được kích thích (các hình từ D đến F) được đánh dấu bằng LAG-3 mAb 1 (các hình A và D), LAG-3 mAb 2 (các hình B và E), hoặc LAG-3 mAb 3 (các hình C và F). Tất cả các tế bào được nhuộm đồng thời bằng kháng thể kháng CD4.

Fig. 13 (các hình từ A đến D) cho thấy rằng các kháng thể kháng LAG-3 đã phân lập liên kết với các tế bào T được kích thích mà không liên kết với các tế bào T không được kích thích. Phân tích đếm tế bào theo dòng của các tế bào T CD4+ kích thích bởi CD3/CD28 (các hình từ A đến B) và các tế bào T CD4+ không được kích thích (các hình từ C đến D) được đánh dấu bằng LAG-3 mAb 4 (các hình A và C), hoặc LAG-3 mAb 5 (các hình B và D). Tất cả các tế bào được nhuộm đồng thời bằng kháng thể kháng CD4.

Fig. 14 (các hình từ A đến D) cho thấy rằng sự biểu hiện của LAG-3 và PD-1 được điều hòa tăng trên các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được kích thích bằng kháng nguyên tuýp B nội độc tố *Staphylococcus aureus* (SEB) từ đối tượng cho đại diện D:34765. Phân tích đếm tế bào theo dòng của các PBMC được kích thích bằng SEB từ đối tượng cho đại diện 48 giờ sau khi kích thích lần đầu (các hình từ A đến B) được đánh dấu bằng các kháng thể kháng LAG-3/kháng CD3 (Hình A), hoặc các kháng thể kháng PD-1/kháng CD3 (Hình B) và năm ngày sau kích thích bằng SEB (các hình từ C đến D) các tế bào được xử lý bằng một mình SEB (Hình C) hoặc bằng kháng thể đối chứng isotyp (Hình D) trong khi kích thích lần hai, được đánh dấu bằng các kháng thể kháng LAG-3/kháng PD-1.

Fig. 15 (các hình từ A đến D) cho thấy rằng sự biểu hiện của LAG-3 và PD-1 được điều hòa tăng trên các PBMC được kích thích bằng SEB từ một đối tượng cho đại diện khác D:53724. Phân tích đếm tế bào theo dòng của PBMC được kích thích bằng SEB từ đối tượng cho đại diện 48 giờ sau kích thích lần đầu (các hình từ A đến B) được đánh dấu bằng các kháng thể kháng LAG-3/kháng CD3 (Hình A), hoặc các kháng thể kháng PD-1/kháng CD3 (Hình B) và năm ngày sau kích thích bằng SEB (các hình từ C đến D) các tế bào được xử lý bằng một mình SEB (Hình C) hoặc bằng kháng thể đối chứng isotyp (Hình D) được đánh dấu bằng các kháng thể kháng LAG-3/kháng PD-1.

Các hình vẽ từ Fig. 16A đến Fig. 16B cho thấy rằng LAG-3 mAb 1 có khả năng kích thích sự sản sinh xytokin đến mức tương đương với khi xử lý bằng các kháng thể kháng PD-1. Profin bài tiết IFNγ (Fig. 16A) và TNFα (Fig. 16B), từ các PBMC được kích thích bằng SEB được xử lý bằng các kháng thể kháng LAG-3 hoặc kháng PD-1.

Fig. 17 cho thấy rằng LAG-3 mAb 1 có khả năng kích thích sự sản sinh xytokin đến mức tương đương với khi xử lý bằng các kháng thể kháng PD-1 và rằng việc xử lý bằng LAG-3 mAb 1 kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đem lại sự tăng cường giải phóng xytokin lớn nhất. Profin bài tiết IFNγ từ các PBMC được kích thích bằng SEB được xử lý bằng các kháng thể kháng LAG-3 và kháng PD-1 một mình và kết hợp.

Các hình vẽ từ Fig. 18A đến Fig. 18B thể hiện sự liên kết của các kháng thể kháng LAG-3 hLAG-3 mAb 6 (1.1), và LAG-3 mAb A với LAG-3 nội sinh biểu hiện trên các PBMC ở khỉ đầu chó được kích thích bằng SEB từ hai đối tượng cho (các hình vẽ Fig. 18A và Fig. 18B). Kháng thể PD-1 mAb A kháng PD-1 được chọn làm đối chứng dương đối với sự kích thích của SEB.

**Mô tả chi tiết sáng chế**

Sáng chế đề cập đến các phân tử liên kết LAG-3 mà bao gồm miền liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 được lựa chọn: LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 có khả năng liên kết với cả LAG-3 ở khỉ đầu chó và LAG-3 ở người. Sáng chế đề cập cụ thể đến các phân tử liên kết LAG-3 mà được làm giống như của người hoặc các phiên bản thể khảm của các kháng thể này, hoặc bao gồm các mảnh liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 này (đặc biệt là các thể tiếp hợp miễn dịch, các kháng tổ hợp kép, BiTE, các kháng thể đặc hiệu kép, *v.v.*). Sáng chế đề cập cụ thể đến các phân tử liên kết LAG-3 như vậy mà còn có khả năng liên kết epitop của phân tử liên quan đến việc điều hòa điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sử dụng các phân tử liên kết LAG-3 này để phát hiện LAG-3 hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp trị liệu kết hợp trong đó phân tử liên kết LAG-3 bao gồm một hoặc nhiều miền liên kết LAG-3 của các kháng thể kháng LAG-3 được lựa chọn này được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều các phân tử bổ sung có hiệu quả trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch để nhờ đó tăng cường, kích thích hoặc điều hòa tăng hơn nữa đáp ứng miễn dịch này ở đối tượng.

I. Các kháng thể và miền liên kết của chúng

Các kháng thể theo sáng chế là các phân tử globulin miễn dịch có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với đích, như hydrat cacbon, polynucleotit, lipit, polypeptit, *v.v.*, thông qua ít nhất một vị trí nhận diện epitop, được định vị trong miền biến đổi của phân tử globulin miễn dịch đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với polypeptit hoặc protein hoặc phân tử không phải protein do sự có mặt của miền hoặc gốc hoặc cấu tạo cụ thể ("epitop") trên phân tử này. Phân tử chứa epitop có thể có hoạt tính gây miễn dịch, để nó tạo ra đáp ứng sản sinh kháng thể ở động vật; các phân tử này được gọi là "kháng nguyên"). Các phân tử chứa epitop không cần thiết phải tạo miễn dịch.

Các miền liên kết theo sáng chế liên kết với các epitop theo cách "đặc hiệu miễn dịch". Như được sử dụng ở đây, kháng thể, kháng tổ hợp kép hoặc phân tử liên kết epitop khác được đề cập đến là liên kết "theo cách đặc hiệu miễn dịch" (hoặc để có sự liên kết "đặc hiệu" với) vùng của một phân tử khác (nghĩa là, epitop) nếu nó phản ứng hoặc liên kết thường xuyên hơn, nhanh chóng hơn, với khoảng thời gian dài hơn và/hoặc với ái lực lớn hơn so với các epitop thay thế. Ví dụ, kháng thể mà liên kết đặc hiệu với epitop LAG-3 là kháng thể liên kết với epitop LAG-3 này với ái lực, ái tính lớn hơn, dễ dàng hơn, và/hoặc khoảng thời gian dài hơn so với khi nó liên kết với các epitop LAG-3 khác hoặc với epitop không phải của LAG-3. Cũng cần hiểu rõ khi đọc định nghĩa này rằng, ví dụ, kháng thể (hoặc gốc hoặc epitop) mà liên kết theo cách đặc hiệu miễn dịch với đích thứ nhất có thể hoặc không thể liên kết theo cách đặc hiệu hoặc theo cách ưu tiên với đích thứ hai. Vì vậy, "liên kết đặc hiệu miễn dịch" không nhất thiết phải cần đến (mặc dù nó có thể bao gồm) liên kết riêng. Nhìn chung, nhưng không cần thiết, khi nói đến liên kết có nghĩa là liên kết "đặc hiệu". Hai phân tử được nói đến là có khả năng liên kết với một phân tử khác theo cách "đặc hiệu sinh lý", nếu sự liên kết này thể hiện tính đặc hiệu với các thụ thể để liên kết với các phối tử tương ứng của chúng. Khả năng của kháng thể trong việc liên kết theo cách đặc hiệu miễn dịch với epitop có thể được xác định bởi, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch.

Các kháng thể tự nhiên (như các kháng thể IgG) gồm hai chuỗi nhẹ được tạo phức với hai chuỗi nặng. Mỗi chuỗi nhẹ chứa miền biến đổi (VL) và miền hằng định (CL). Mỗi chuỗi nặng chứa miền biến đổi (VH), ba miền hằng định (CH1, CH2 và CH3), và miền "bản lề" ("H") nằm giữa các miền CH1 và CH2. Đơn vị cấu trúc cơ sở của các globulin miễn dịch có trong tự nhiên (ví dụ, IgG) theo đó là tetrame có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, thường được biểu hiện dưới dạng glycoprotein

khoảng 150.000 Da. Phần đầu tận amino ("đầu tận N") của mỗi chuỗi bao gồm miền biến đổi chứa khoảng từ 100 đến 110 hoặc trên 110 axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm nhận diện kháng nguyên. Phần đầu tận carboxy ("đầu tận C") của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định, với các chuỗi nhẹ có một miền hằng định và các chuỗi nặng thường có ba miền hằng định và một miền bản lề. Do đó, cấu trúc của các chuỗi nặng của phân tử IgG là n-VL-CL-c và cấu trúc của các chuỗi nặng IgG là n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (trong đó n và c, một cách tương ứng, là đầu tận N và đầu tận C của polypeptit). Khả năng của một kháng thể trong việc liên kết với epitop của kháng nguyên phụ thuộc vào sự có mặt và trình tự axit amin của các miền VL và VH của kháng thể đó. Sự tương tác của chuỗi nhẹ của kháng thể và chuỗi nặng của kháng thể và, cụ thể là, sự tương tác của các miền VL và VH của nó tạo ra một trong số hai vị trí liên kết epitop của kháng thể tự nhiên. Các kháng thể tự nhiên có khả năng liên kết chỉ với một loại epitop (nghĩa là, chúng là đơn đặc hiệu), mặc dù chúng có thể liên kết với nhiều bản sao của loài đó (nghĩa là, thể hiện hai giá hoặc đa giá). Các miền biến đổi của phân tử IgG gồm các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR), chứa các gốc tiếp xúc với epitop, và các đoạn không phải CDR, được đề cập đến là đoạn khung (FR), mà thường duy trì cấu trúc và quyết định vị trí của các vòng CDR để cho phép sự tiếp xúc như vậy (mặc dù một số gốc khung nhất định cũng có thể tiếp xúc kháng nguyên). Do đó, các miền $V_L$ và VH có cấu trúc n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c. Polypeptit mà là (hoặc có thể hoạt động như) CDR thứ nhất, thứ hai và thứ ba của chuỗi nhẹ của kháng thể được quy định một cách tương ứng trong bản mô tả là miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$. Tương tự, các polypeptit mà là (hoặc có thể hoạt động như) CDR thứ nhất, thứ hai và thứ ba của chuỗi nặng của kháng thể được quy định một cách tương ứng trong bản mô tả là miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$. Do đó, các thuật ngữ miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, miền $CDR_L3$, miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ đều đề cập đến polypeptit mà khi được kết hợp vào protein thì khiến cho protein đó có khả năng liên kết với epitop đặc hiệu bất kể việc protein này là kháng thể có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc kháng tổ hợp kép hoặc phân tử liên kết chuỗi đơn (ví dụ, scFv, BiTe, *v.v.*), hay là một loại protein khác. Do đó, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền liên kết epitop" dùng để chỉ phần của phân tử liên kết epitop mà có thể chịu trách nhiệm đối với khả năng liên kết theo cách đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân

tử này. Mảnh liên kết epitop có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5 hoặc toàn bộ 6 miền CDR trong số các miền CDR của kháng thể này và, mặc dù có khả năng liên kết theo cách đặc hiệu miễn dịch với epitop này, có thể thể hiện tính đặc hiệu miễn dịch, ái lực hoặc tính chọn lọc đối với epitop này mà khác với tính đặc hiệu miễn dịch, ái lực hoặc tính chọn lọc của kháng thể này. Tuy nhiên, tốt hơn là mảnh liên kết epitop sẽ chứa toàn bộ 6 miền CDR của kháng thể này. Mảnh liên kết epitop của kháng thể có thể là một chuỗi polypeptit (ví dụ, scFv), hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều hơn hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có đầu tận amino và đầu tận carboxy (ví dụ, kháng tổ hợp kép, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, *v.v.*).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" bao gồm các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa đặc hiệu, các kháng thể của người, các kháng thể được làm giống như của người, các kháng thể tổng hợp, các kháng thể khảm, các kháng thể đa dòng, các kháng thể được làm giống như của lạc đà, Fvs chuỗi đơn (scFv), các kháng thể chuỗi đơn, các mảnh kháng thể hoạt hóa miễn dịch (ví dụ, các mảnh kháng thể có khả năng liên kết với epitop, ví dụ, các mảnh Fab, các mảnh Fab', các mảnh $F(ab')_2$, các mảnh Fv, các mảnh chứa miền $V_L$ và/hoặc miền $V_H$, hoặc chứa 1, 2, hoặc 3 vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) của miền VL này (nghĩa là, $CDR_L1$, $CDR_L2$, và/hoặc $CDR_L3$) hoặc miền VH (nghĩa là, $CDR_H1$, $CDR_H2$, và/hoặc $CDR_H3$)) mà liên kết đặc hiệu kháng nguyên, *v.v.*, các kháng thể hai chức hoặc đa chức, Fvs đặc hiệu kép được liên kết disulfua (sdFv), các kháng thể hoạt động nội bào, và các kháng tổ hợp kép, và các mảnh liên kết epitop của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Cụ thể, thuật ngữ "kháng thể" được dự định là bao gồm các phân tử globulin miễn dịch và các mảnh có hoạt tính miễn dịch của các phân tử globulin miễn dịch, nghĩa là, các phân tử chứa vị trí liên kết epitop. Các phân tử globulin miễn dịch có thể thuộc tuýp bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), lớp (ví dụ, $IgG_1$, $IgG_2$, $IgG_3$, $IgG_4$, $IgA_1$ và $IgA_2$) hoặc lớp phụ (xem, ví dụ, Công bố đơn sáng chế Mỹ số: 20040185045; 20050037000; 20050064514; 20050215767; 20070004909; 20070036799; 20070077246; và 20070244303). Một vài thập kỷ mới đây đã cho thấy sự trở lại đáng quan tâm về hiệu quả điều trị bệnh của kháng thể, và các kháng thể này đã trở thành một trong các nhóm thuốc dẫn đầu có nguồn gốc từ công nghệ sinh học (Chan, C.E. *et al.* (2009) "*The Use Of Antibodies In The*

*Treatment Of Infectious Diseases*", Singapore Med. J. 50(7):663-666). Trên 200 loại thuốc gốc kháng thể đã được phê duyệt để sử dụng hoặc đang được phát triển.

Các kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế bao gồm các biến thể được làm giống như của người, khảm hoặc được làm giống như của chó của các kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" dùng để chỉ kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ giống hệt hoặc đồng nhất với kháng thể từ một loài (ví dụ, chuột nhắt) hoặc lớp hoặc lớp phụ kháng thể, trong khi phần còn lại thì giống hệt hoặc đồng nhất với kháng thể của một loài khác (ví dụ, người) hoặc lớp hoặc lớp phụ kháng thể khác, miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn. Các kháng thể khảm đang quan tâm ở đây bao gồm các kháng thể "được làm giống như của động vật linh trưởng" bao gồm các trình tự liên kết kháng nguyên của miền biến đổi có nguồn gốc từ động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ cựu thế giới, khỉ không đuôi, *v.v.*) và trình tự vùng hằng định của người.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ kháng thể trong tập hợp của các kháng thể về cơ bản đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng lẻ bao gồm trong tập hợp này giống hệt nhau ngoại trừ các kháng thể có thể có mang các đột biến có trong tự nhiên mà có thể có mặt với lượng nhỏ, và thuật ngữ "kháng thể đa dòng" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ kháng thể thu được từ tập hợp của các kháng thể không đồng nhất. Thuật ngữ "đơn dòng" dùng để chỉ đặc điểm của kháng thể là tập hợp về cơ bản đồng nhất của các kháng thể, và không được hiểu là đòi hỏi sự sản sinh kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ (ví dụ, bằng phương pháp tế bào lai, chọn lọc thể thực khuẩn, biểu hiện tái tổ hợp, động vật chuyển gen, *v.v.*). Thuật ngữ này bao gồm các globulin miễn dịch nguyên vẹn cũng như các mảnh *v.v.* được mô tả ở trên theo định nghĩa về "kháng thể". Các phương pháp tạo các kháng thể đơn dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp có thể được sử dụng là phương pháp nêu trong tài liệu Kohler, G. *et al.* (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*", Nature 256:495-497 hoặc cải biên của tài liệu này. Thông thường, các kháng thể đơn

dòng được phát triển ở chuột nhắt, chuột cống hoặc thỏ. Các kháng thể này được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch cho động vật bằng một lượng tạo miễn dịch của tế bào, dịch chiết tế bào, hoặc các dạng bào chế protein mà chứa epitop mong muốn. Chất sinh miễn dịch có thể là, nhưng không giới hạn ở, các tế bào sơ cấp, dòng tế bào được nuôi cấy, tế bào ung thư, protein, peptit, axit nucleic, hoặc mô. Các tế bào được sử dụng để tạo miễn dịch có thể được nuôi cấy trong một khoảng thời gian (ví dụ, ít nhất là 24 giờ) trước khi sử dụng chúng làm chất kháng nguyên. Các tế bào có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch một mình hoặc kết hợp với chất phù trợ không biến tính, như Ribi (xem, ví dụ, Jennings, V.M. (1995) "*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*", ILAR J. 37(3):119-125). Nhìn chung, các tế bào nên được giữ nguyên vẹn và tốt hơn là có thể sống khi được sử dụng làm chất sinh miễn dịch. Các tế bào nguyên vẹn có thể cho phép kháng nguyên dễ được phát hiện ra hơn so với các tế bào bị phá vỡ bởi động vật đã được tạo miễn dịch. Sử dụng các chất phù trợ biến tính hoặc thô, ví dụ, chất phù trợ Freud, có thể phá vỡ các tế bào và do đó được làm mất hiệu lực. Chất sinh miễn dịch này có thể được sử dụng nhiều lần ở các khoảng cách định kỳ như, hai tuần một lần, hoặc hằng tuần, hoặc có thể được sử dụng theo cách như vậy để duy trì khả năng sống của động vật (ví dụ, trong thể tái tổ hợp mô). Theo cách khác, các kháng thể đơn dòng hiện có và các kháng thể tương đương bất kỳ khác mà đặc hiệu miễn dịch đối với epitop gây bệnh mong muốn có thể được giải trình tự và được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng phương tiện đã biết bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, kháng thể này được giải trình tự và sau đó trình tự polynucleotit được tách dòng thành vectơ để biểu hiện hoặc nhân giống. Trình tự mã hóa kháng thể đang quan tâm có thể được duy trì trong vectơ ở tế bào chủ và sau đó tế bào chủ này có thể được nhân rộng và cấp đông để sử dụng trong tương lai. Trình tự polynucleotit của các kháng thể này có thể được sử dụng cho thao tác di truyền để tạo ra các phân tử đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép, đặc hiệu ba và đặc hiệu bốn) theo sáng chế cũng như ái lực được tối ưu hóa, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, và/hoặc kháng thể được làm giống như của chó, để cải thiện ái lực, hoặc các đặc điểm khác của kháng thể đó.

Thuật ngữ "scFv" dùng để chỉ các mảnh miền biến đổi chuỗi đơn. Các phân tử scFv được tạo thành bằng cách liên kết miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ sử dụng peptit liên kết ngắn. Bird *et al.* (1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*", Science 242:423-426) mô tả ví dụ về các peptit liên kết mà liên kết cầu xấp xỉ 3,5 nm giữa đầu tận carboxy của một miền biến đổi và đầu tận amino của miền biến đổi còn lại. Các tác nhân liên kết của các trình tự khác đã được chỉ định và được sử dụng (Bird *et al.* (1988) "*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*", Science 242:423-426). Các tác nhân liên kết có thể theo đó được cải biến về các chức năng bổ sung, như chức năng gắn của thuốc hoặc chức năng gắn với các lớp nền rắn. Các biến thể chuỗi đơn có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp hoặc theo cách tổng hợp. Đối với việc sản xuất tổng hợp scFv, thiết bị tổng hợp tự động có thể được sử dụng. Đối với việc sản xuất tái tổ hợp scFv, plasmit thích hợp chứa polynucleotit mà mã hóa scFv có thể được đưa vào tế bào chủ thích hợp, là sinh vật có nhân điển hình, như các tế bào nấm men, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú, hoặc sinh vật chưa có nhân điển hình, như E. coli. Polynucleotit mã hóa scFv đang quan tâm có thể được tạo thành bằng các thao tác thông thường như kỹ thuật nối các polynucleotit. scFv tạo thành có thể được phân lập bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế cụ thể bao gồm các biến thể được làm giống như của người của các kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế và các phân tử liên kết đa đặc hiệu chứa chúng. Thuật ngữ kháng thể "được làm giống như của người" dùng để chỉ phân tử thể khảm, thường được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, có vị trí liên kết epitop của globulin miễn dịch từ loài không phải người và cấu trúc globulin miễn dịch còn lại của phân tử dựa trên cấu trúc và/hoặc trình tự của globulin miễn dịch ở người. Vị trí liên kết epitop có thể bao gồm các miền biến đổi hoàn toàn được dung hợp lên trên các miền hằng định hoặc chỉ các CDR được ghép lên trên các vùng khung thích hợp trong các miền biến đổi. Vị trí liên kết epitop có thể là kiểu dại hoặc được biến đổi bằng một hoặc nhiều đoạn thay thế axit amin. Vị trí này loại trừ vùng hằng định là chất sinh miễn dịch trong các cá thể người, nhưng khả năng đáp ứng miễn dịch đối với vùng biến đổi ngoại lai thì vẫn còn (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune*

*Response*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Một hướng tiếp cận khác tập trung không chỉ vào việc tạo ra các vùng hằng định có nguồn gốc từ người, mà còn cải biến các vùng biến đổi cũng như để tạo lại hình dạng cho chúng gần nhất có thể với hình dạng của người. Đã biết rằng các vùng biến đổi của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đều chứa ba CDR mà thay đổi đáp ứng với kháng nguyên đang nói đến và xác định khả năng liên kết, được chặn bằng bốn vùng khung (FR) được bảo toàn tương đối ở loài nhất định và tạo ra theo cách giả định giàn khung cho các CDR đó. Khi các kháng thể không phải của người được tạo ra đối với kháng nguyên cụ thể, thì vùng biến đổi có thể "được tạo hình lại" hoặc "được làm giống như của người" bằng cách ghép các CDR thu được từ kháng thể không phải của người trên các FR có mặt trong kháng thể người cần được cải biến. Ứng dụng của hướng tiếp cận này cho các kháng thể khác nhau đã được báo cáo trong tài liệu Sato, K. *et al.* (1993) "*Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth*", Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*", Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*", Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*", Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*", Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) "*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) "*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; và Co, M.S. *et al.* (1992) "*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*", J. Immunol. 148:1149-1154. Theo một số phương án, các kháng thể được làm giống như của người bảo toàn tất cả các trình tự CDR (ví dụ, kháng thể chuột nhắt được làm giống như của người mà chứa tất cả sáu CDR từ kháng thể chuột nhắt). Theo các phương án khác, các kháng

thể được làm giống như của người có một hoặc nhiều CDR (một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu) được biến đổi (các) trình tự axit amin của chúng so với kháng thể ban đầu, mà còn được gọi là một hoặc nhiều CDR "có nguồn gốc từ" một hoặc nhiều CDR từ kháng thể ban đầu (nghĩa là, có nguồn gốc từ các CDR này, thu được từ kiến thức về các trình tự axit amin của các CDR này, *v.v.*). Trình tự polynucleotit mã hóa miền biến đổi của kháng thể có thể được sử dụng để tạo ra các dẫn xuất như vậy và để cải thiện ái lực, hoặc các đặc tính khác của các kháng thể này. Nguyên lý chung để làm cho kháng thể giống như của người bao gồm việc giữ lại trình tự cơ sở của phần liên kết epitop của kháng thể này, trong khi trao đổi phần còn lại không phải của người của kháng thể này với các trình tự kháng thể của người. Có bốn bước chung để làm cho kháng thể đơn dòng giống như của người. Các bước này là: (1) xác định trình tự nucleotit và trình tự axit amin được dự đoán của các miền biến đổi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể ban đầu (2) thiết kế kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể được làm giống như của chó, nghĩa là, quyết định vùng khung của kháng thể nào được sử dụng trong quy trình làm cho giống như của người hoặc làm cho giống như của chó (3) sử dụng các hệ phương pháp/kỹ thuật làm cho giống như của người hoặc làm cho giống như của chó trong thực tế và (4) chuyển nhiễm và biểu hiện kháng thể được làm giống như của người đó. Xem, ví dụ, các Patent Mỹ số 4816567; 5807715; 5866692; và 6331415.

Vị trí liên kết epitop của các phân tử theo sáng chế có thể bao gồm miền biến đổi hoàn toàn được dung hợp với miền hằng định hoặc chỉ các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) của miền biến đổi này được ghép với các vùng khung thích hợp. Vị trí liên kết epitop có thể là kiểu dại hoặc được biến đổi bằng một hoặc nhiều đoạn thay thế axit amin. Vị trí này loài trừ vùng hằng định là chất sinh miễn dịch ở các cá thể người, nhưng khả năng đáp ứng miễn dịch với miền biến đổi thì vẫn còn (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Một hướng tiếp cận khác không chỉ tập trung vào việc tạo ra các vùng hằng định có nguồn gốc từ người, mà còn cải biến các miền biến đổi cũng như để tạo lại hình dạng cho chúng gần nhất có thể với hình dạng của người. Đã biết rằng các miền biến đổi của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đều chứa ba vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) mà thay đổi đáp

ứng với kháng nguyên đang nói đến và xác định khả năng liên kết, được chặn bằng bốn vùng khung (FR) được bảo toàn tương đối ở loài nhất định và tạo ra theo cách giả định giàn khung đối với các CDR này. Khi các kháng thể không phải của người được tạo ra đối với kháng nguyên cụ thể, thì các miền biến đổi có thể "được tạo lại hình dạng" hoặc "được làm giống như của người" bằng cách ghép các CDR có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người trên các FR có mặt trong kháng thể người cần được cải biến. Ứng dụng của hướng tiếp cận này với các kháng thể khác nhau đã được báo cáo trong tài liệu Sato, K. *et al.* (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*", Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*", Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*", Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*", Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) "*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) "*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; và Co, M.S. *et al.* (1992) "*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*", J. Immunol. 148:1149-1154. Theo một số phương án, các kháng thể được làm giống như của người bảo toàn tất cả các trình tự CDR (ví dụ, kháng thể chuột nhắt được làm giống như của người chứa tất cả sáu CDR từ các kháng thể chuột nhắt). Theo các phương án khác, các kháng thể được làm giống như của người có một hoặc nhiều CDR (một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) khác về trình tự so với kháng thể ban đầu.

Một số phân tử kháng thể "được làm giống như của người" bao gồm vị trí liên kết epitop có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người đã được mô tả, bao gồm các kháng thể khảm có miền biến đổi của loài gặm nhấm hoặc của loài gặm

nhấm được cải biến và các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) có liên quan của chúng được dung hợp với miền hằng định của người (xem, ví dụ, Winter *et al.* (1991) "*Man-made Antibodies*", Nature 349:293-299; Lobuglio *et al.* (1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw *et al.* (1987) "*Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen*", J. Immunol. 138:4534-4538, và Brown *et al.* (1987) "*Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody*", Cancer Res. 47:3577-3583). Các tài liệu tham khảo khác mô tả các CDR ở loài gặm nhấm được ghép vào vùng khung (FR) đỡ của người trước khi dung hợp với miền hằng định của kháng thể người thích hợp (xem, ví dụ, Riechmann, L. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*", Science 239:1534-1536; và Jones *et al.* (1986) "*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse*", Nature 321:522-525). Một tài liệu tham khảo khác mô tả các CDR ở loài gặm nhấm được đỡ bởi vùng khung của loài gặm nhấm được phủ theo cách tái tổ hợp. Xem, ví dụ, Công bố đơn sáng chế châu Âu số 519596. Các phân tử "được làm giống như của người" này được thiết kế để giảm thiểu tối đa đáp ứng miễn dịch không mong muốn đối với các phân tử kháng thể loài gặm nhấm kháng người, mà hạn chế khoảng thời gian và tính hiệu quả của các ứng dụng điều trị bệnh của các gốc đó ở người tiếp nhận. Các phương pháp khác để làm cho kháng thể giống như của người mà cũng có thể được sử dụng được bộc lộ trong tài liệu Daugherty *et al.* (1991) "*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*", Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 và các Patent Mỹ số 6180377; 6054297; 5997867; và 5866692.

II. Các thụ thể Fcγ (FcγR)

Các miền CH2 và CH3 của hai chuỗi nặng tương tác để tạo ra vùng Fc, là miền được nhận diện bởi các thụ thể Fc trong tế bào bao gồm nhưng không giới hạn ở các thụ thể Fc gama (FcγR). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vùng Fc" được sử

dụng để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng IgG. Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG1 ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:1):

```
231       240          250          260          270          280
APELLGGPSV   FLFPPKPKDT   LMISRTPEVT   CVVVDVSHED   PEVKFNWYVD

          290          300          310          320          330
GVEVHNAKTK   PREEQYNSTY   RVVSVLTVLH   QDWLNGKEYK   CKVSNKALPA

          340          350          360          370          380
PIEKTISKAK   GQPREPQVYT   LPPSREEMTK   NQVSLTCLVK   GFYPSDIAVE

          390          400          410          420          430
WESNGQPENN   YKTTPPVLDS   DGSFFLYSKL   TVDKSRWQQG   NVFSCSVMHE

          440       447
ALHNHYTQKS   LSLSPGX
```

như được đánh số bằng chỉ số EU theo Kabat, trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG2 ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:2):

```
231       240          250          260          270          280
APPVA-GPSV   FLFPPKPKDT   LMISRTPEVT   CVVVDVSHED   PEVQFNWYVD

          290          300          310          320          330
GVEVHNAKTK   PREEQFNSTF   RVVSVLTVVH   QDWLNGKEYK   CKVSNKGLPA

          340          350          360          370          380
PIEKTISKTK   GQPREPQVYT   LPPSREEMTK   NQVSLTCLVK   GFYPSDISVE

          390          400          410          420          430
WESNGQPENN   YKTTPPMLDS   DGSFFLYSKL   TVDKSRWQQG   NVFSCSVMHE

          440       447
ALHNHYTQKS   LSLSPGX
```

như được đánh số bằng chỉ số EU theo Kabat, trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG3 ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:3):

```
231       240          250          260          270          280
APELLGGPSV   FLFPPKPKDT   LMISRTPEVT   CVVVDVSHED   PEVQFKWYVD

          290          300          310          320          330
GVEVHNAKTK   PREEQYNSTF   RVVSVLTVLH   QDWLNGKEYK   CKVSNKALPA

          340          350          360          370          380
PIEKTISKTK   GQPREPQVYT   LPPSREEMTK   NQVSLTCLVK   GFYPSDIAVE

          390          400          410          420          430
WESSGQPENN   YNTTPPMLDS   DGSFFLYSKL   TVDKSRWQQG   NIFSCSVMHE

          440       447
ALHNRFTQKS   LSLSPGX
```

như được đánh số bằng chỉ số EU theo Kabat, trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG4 ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:4):

```
231       240          250          260          270          280
APEFLGGPSV   FLFPPKPKDT   LMISRTPEVT   CVVVDVSQED   PEVQFNWYVD

          290          300          310          320          330
GVEVHNAKTK   PREEQFNSTY   RVVSVLTVLH   QDWLNGKEYK   CKVSNKGLPS

          340          350          360          370          380
SIEKTISKAK   GQPREPQVYT   LPPSQEEMTK   NQVSLTCLVK   GFYPSDIAVE

          390          400          410          420          430
WESNGQPENN   YKTTPPVLDS   DGSFFLYSRL   TVDKSRWQEG   NVFSCSVMHE

          440       447
ALHNHYTQKS   LSLSLGX
```

như được đánh số bằng chỉ số EU theo Kabat, trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt.

Trong toàn bộ bản mô tả, việc đánh số các gốc trong vùng hằng định của chuỗi nặng IgG là việc đánh số bằng chỉ số EU theo Kabat *et al.,* SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991)

("Kabat"), được kết hợp rõ ràng trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. "Chỉ số EU theo Kabat" dùng để chỉ việc đánh số của kháng thể EU của IgG1 ở người. Các axit amin từ các miền biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thuần thục của globulin miễn dịch được chỉ định bởi vị trí của axit amin trong chuỗi, và các CDR được xác định bởi Kabat (cần hiểu rằng $CDR_H1$ như được định nghĩa trong tài liệu Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "*Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*",. J. Mol. Biol. 196:901-917) bắt đầu sớm hơn năm chuỗi). Kabat mô tả nhiều trình tự axit amin cho kháng thể, nhận biết trình tự liên ứng của axit amin đối với mỗi nhóm phụ, và gán số gốc cho mỗi axit amin. Sơ đồ đánh số Kabat có thể mở rộng đến các kháng thể không được bao gồm trong bản tóm tắt bằng cách sắp hàng kháng thể đang nói đến với một trong số các trình tự liên ứng theo Kabat bằng cách tham chiếu đến các axit amin được bảo toàn. Phương pháp dùng để gán số gốc này đã trở thành tiêu chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này và dễ dàng nhận biết các axit amin ở các vị trí tương đương trong các kháng thể khác nhau, bao gồm các biến thể khảm hoặc được làm giống như của người. Ví dụ, axit amin ở vị trí 50 của chuỗi nhẹ của kháng thể người chiếm vị trí tương đương với axit amin ở vị trí 50 trong chuỗi nhẹ của kháng thể chuột nhắt.

Hiện tượng đa hình đã được quan sát thấy ở một số vị trí khác nhau trong các vùng hằng định của kháng thể (ví dụ, các vị trí Fc, gồm nhưng không giới hạn ở các vị trí 270, 272, 312, 315, 356 và 358 như được đánh số bằng chỉ số EU theo Kabat), và do đó các sai khác không đáng kể giữa trình tự được thể hiện và các trình tự trong tình trạng kỹ thuật có thể tồn tại. Dạng đa hình của các globulin miễn dịch của người đã được mô tả kỹ lưỡng. Hiện tại, 18 alotyp Gm đã được biết đến: G1m (1, 2, 3, 17) hoặc G1m (a, x, f, z), G2m (23) hoặc G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) hoặc G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, *et al.*, "*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation*". Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. *et al.*, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Được dự tính cụ thể rằng các kháng thể theo sáng chế có thể kết hợp alotyp bất kỳ, isoalotyp, hoặc haplotyp của gen globulin miễn dịch bất kỳ, và không giới hạn ở alotyp, isoalotyp hoặc haplotyp của các trình tự được đề xuất trong bản mô tả này. Hơn nữa, trong một số hệ biểu hiện, gốc axit amin đầu tận C

(được in đậm ở trên) của miền CH3 có thể được loại bỏ sau dịch mã. Theo đó, gốc đầu tận C của miền CH3 là gốc axit amin tùy ý trong các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các phân tử liên kết LAG-3 thiếu gốc đầu tận C của miền CH3. Sáng chế cũng đề cập cụ thể đến các cấu trúc chứa gốc lysin đầu tận C như vậy của miền CH3.

Các tín hiệu hoạt hóa và ức chế được tải nạp thông qua việc vùng Fc nối với thụ thể Fc của tế bào (FcγR). Khả năng nối để thu được các chức năng hoàn toàn đối lập như vậy là do các sai khác về cấu trúc giữa các dạng đồng đẳng của thụ thể khác nhau. Hai miền riêng biệt trong các miền truyền tín hiệu tế bào chất của thụ thể được gọi là các motip hoạt hóa dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (ITAM) và motip ức chế dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (ITIM) xét theo các đáp ứng khác nhau. Việc thu nhận thêm các enzym tế bào chất khác nhau vào các cấu trúc này chỉ ra kết quả của các đáp ứng tế bào qua trung gian FcγR. Các phức hợp FcγR chứa ITAM bao gồm FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, trong khi các phức hợp chứa ITIM chỉ bao gồm FcγRIIB. Các bạch cầu trung tính ở người biểu hiện gen FcγRIIA. Việc tạo cụm FcγRIIA thông qua các phức hợp miễn dịch hoặc liên kết chéo kháng thể đặc hiệu là nhằm để kết tập các ITAM cùng với các kinaza có liên quan đến thụ thể mà tạo thuận lợi cho sự phosphoryl hóa của ITAM. Sự phosphoryl hóa của ITAM nhằm làm vị trí liên kết đối với Syk kinaza, việc hoạt hóa sự phosphoryl hóa của ITAM này dẫn đến hoạt hóa các cơ chất xuôi chiều (ví dụ, $PI_3K$). Sự hoạt hóa của tế bào dẫn đến việc giải phóng các chất trung gian tiền viêm. Gen FcγRIIB được biểu hiện trên các tế bào lympho B; miền ngoại bào của nó giống hệt 96% với FcγRIIA và liên kết với các phức hợp IgG theo cách không thể phân biệt được. Sự có mặt của ITIM trong miền tế bào chất của FcγRIIB định ra lớp phụ ức chế này của FcγR. Gần đây, cơ sở phân tử của sự ức chế này đã được thiết lập. Khi được nối đồng thời cùng với FcγR hoạt hóa, thì ITIM trong FcγRIIB bắt đầu được phosphoryl hóa và thu hút miền SH2 của inositol polyphosphat 5'-phosphataza (SHIP), mà thủy phân các vật truyền tin phosphoinositol đã được giải phóng dưới dạng kết quả của việc hoạt hóa tyrosin kinaza qua trung gian FcγR chứa ITAM, từ đó ngăn chặn dòng vào của $Ca^{++}$ nội bào. Theo đó việc liên kết chéo của FcγRIIB làm giảm đáp ứng hoạt hóa với sự nối FcγR

và ức chế tính đáp ứng của tế bào. Sự hoạt hóa tế bào B, sự tăng sinh tế bào B và sự bài tiết của kháng thể vì thế được ngăn chặn.

III. Các kháng thể đặc hiệu kép, các kháng tổ hợp képtổ hợp kép đa đặc hiệu và các kháng tổ hợp kép DART®

Chức năng của các kháng thể có thể được tăng cường bằng cách tạo ra các phân tử gốc kháng thể đa đặc hiệu mà có thể liên kết đồng thời với hai kháng nguyên riêng rẽ và riêng biệt (hoặc các epitop khác nhau của cùng một kháng nguyên) và/hoặc bằng cách tạo ra phân tử gốc kháng thể có hóa trị cao hơn (nghĩa là, nhiều hơn hai vị trí liên kết) đối với cùng một epitop và/hoặc kháng nguyên.

Để tạo ra các phân tử có khả năng lớn hơn so với các kháng thể tự nhiên, rất nhiều dạng kháng thể đặc hiệu kép tái tổ hợp khác nhau đã được phát triển (xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), hầu hết trong số đều chúng sử dụng các peptit liên kết để dung hợp một mảnh liên kết epitop khác (ví dụ, scFv, VL, VH, *v.v.*) với, hoặc trong lõi kháng thể (IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM), hoặc để dung hợp nhiều mảnh liên kết epitop (ví dụ, hai mảnh Fab hoặc scFv). Các dạng khác sử dụng peptit liên kết để dung hợp mảnh liên kết epitop (ví dụ, scFv, VL, VH, *v.v.*) với miền dime hóa như miền CH2-CH3 hoặc các polypeptit khác (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Thông thường, các hướng tiếp cận này có sự gây hại và đánh đổi. Ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 2013/174873, WO 2011/133886 và WO 2010/136172 bộc lộ rằng việc sử dụng các tác nhân liên kết có thể gây ra các vấn đề đối với thiết lập điều trị bệnh, và chỉ dẫn kháng thể đặc hiệu ba trong đó các miền CL và CH1 được tách khỏi các vị trí tự nhiên tương ứng của chúng và các miền VL và VH được đa dạng hóa (WO 2008/027236; WO 2010/108127) để cho phép chúng liên kết với nhiều hơn một kháng nguyên. Do đó, các phân tử được bộc lộ trong các tài liệu này trao đổi tính đặc hiệu liên kết với khả năng liên kết với các loại kháng nguyên bổ sung. Công bố đơn quốc tế số WO 2013/163427 và WO 2013/119903 bộc lộ việc cải biến miền CH2 để chứa sản phẩm cộng protein dung hợp bao gồm miền liên kết. Tài liệu này lưu ý rằng miền CH2 dường như chỉ đóng vai trò nhỏ

trong việc điều tiết chức năng tác động. Công bố đơn quốc tế số WO 2010/028797, WO2010028796 và WO 2010/028795 bộc lộ các kháng thể tái tổ hợp mà các vùng Fc của nó được thay thế bằng các miền VL và VH bổ sung, để tạo ra các phân tử liên kết ba giá. Công bố đơn quốc tế số WO 2003/025018 và WO2003012069 bộc lộ các kháng tổ hợp kép tái tổ hợp mà các chuỗi riêng lẻ của chúng chứa miền scFv. Công bố đơn quốc tế số WO 2013/006544 bộc lộ các phân tử Fab đa giá được tổng hợp dưới dạng chuỗi polypeptit đơn và sau đó đưa vào phân giải protein để tạo ra các cấu trúc heterodime. Do đó, các phân tử được bộc lộ trong các tài liệu này trao đổi toàn bộ hoặc một phần khả năng điều tiết chức năng tác động với khả năng liên kết với các loại kháng nguyên bổ sung. Công bố đơn quốc tế số WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 và WO 1991/003493 bộc lộ việc bổ sung miền liên kết bổ sung hoặc nhóm chức vào kháng thể hoặc phần kháng thể (ví dụ, bổ sung kháng tổ hợp kép vào chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc bổ sung các miền VL và VH bổ sung vào chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc bổ sung protein dung hợp khác loài hoặc tạo chuỗi cho nhiều miền Fab với nhau). Do đó, các phân tử được bộc lộ trong các tài liệu này trao đổi cấu trúc kháng thể tự nhiên với khả năng liên kết với các loại kháng nguyên bổ sung.

Tình trạng kỹ thuật còn lưu ý thêm về khả năng tạo ra các kháng tổ hợp kép khác với các kháng thể tự nhiên này ở khả năng liên kết với hai hoặc nhiều hơn hai loại epitop khác nhau (nghĩa là, có tính đặc hiệu kép hoặc tính đa đặc hiệu ngoài hai giá hoặc đa giá) (xem, ví dụ, Holliger *et al.* (1993) "'*Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments",* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Alt *et al.* (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. *et al.* (2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Diabodies To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Olafsen, T. *et al.* (2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*", Protein Eng.

Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. *et al.* (2001) "*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange*", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano *et al.* (2004) "*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System",* Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) "*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Thiết kế của kháng tổ hợp kép là dựa trên dẫn xuất của kháng thể đã được biết đến dưới dạng mảnh của miền biến đổi chuỗi đơn (scFv). Các phân tử này được tạo thành bằng cách liên kết các miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ bằng cách sử dụng peptit liên kết ngắn. Theo đó các tác nhân liên kết có thể được cải biến đối với các chức năng bổ sung, như việc gắn thuốc hoặc gắn vào các lớp nền rắn. Các biến thể chuỗi đơn có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp hoặc theo cách tổng hợp. Đối với việc sản xuất tổng hợp scFv, thiết bị tổng hợp tự động có thể được sử dụng. Đối với việc sản xuất tái tổ hợp scFv, plasmit thích hợp chứa polynucleotit mã mã hóa scFv có thể được đưa vào tế bào chủ thích hợp, hoặc sinh vật có nhân điển hình, như các tế bào nấm men, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú, hoặc sinh vật chưa có nhân điển hình, như *E. coli*. Polynucleotit mã hóa scFv đang quan tâm có thể được tạo thành bằng các thao tác thông thường như thao tác nối các polynucleotit. scFv tạo thành có thể được phân lập bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc tạo ra kháng tổ hợp kép không đặc hiệu đơn đem đến ưu điểm ý nghĩa hơn so với kháng thể, gồm nhưng không giới hạn ở, khả năng nối đồng thời và định vị đồng thời các tế bào mà biểu hiện các epitop khác nhau. Do đó các kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép có các ứng dụng rộng rãi bao gồm trị liệu và chẩn đoán miễn dịch. Tính đặc hiệu kép cho phép tính linh động lớn trong thiết kế và xử lý kỹ thuật cho kháng tổ hợp kép trong nhiều ứng dụng khác nhau, tạo ra ái tính được tăng cường đối với kháng nguyên multime, tính liên kết chéo của kháng nguyên khác nhau, và hướng đích theo định hướng đến các loại tế bào cụ thể dựa vào sự có mặt của cả hai

kháng nguyên đích. Do hóa trị gia tăng, tốc độ phân ly thấp và độ thanh thải nhanh khỏi hệ tuần hoàn của chúng (đối với các kháng tổ hợp kép có kích thước nhỏ, bằng hoặc thấp hơn ~50 kDa), nên các phân tử kháng tổ hợp kép đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng thể hiện tính ứng dụng cụ thể trong lĩnh vực chụp hình khối u (Fitzgerald *et al.* (1997) *"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris",* Protein Eng. 10:1221).

Tính đặc hiệu kép của các kháng tổ hợp kép dẫn đến việc sử dụng chúng để nối đồng thời các tế bào khác nhau, ví dụ, liên kết chéo các tế bào T gây độc tế bào với các tế bào khối u (Staerz *et al.* (1985) *"Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells",* Nature 314:628-631, và Holliger *et al.* (1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Biospecific Diabody",* Protein Eng. 9:299-305; Marvin *et al.* (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, các kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép có thể được sử dụng để nối đồng thời các thụ thể trên bề mặt của các tế bào khác nhau hoặc trên một tế bào. Việc nối đồng thời các tế bào và/hoặc thụ thể khác nhau là hữu ích đối với chức năng tác động điều biến và/hoặc truyền tín hiệu tế bào miễn dịch. Các phân tử đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép) bao gồm vị trí liên kết epitop có thể được định hướng đến yếu tố xác định bề mặt của tế bào miễn dịch bất kỳ như B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70 (CD27L), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), thụ thể hoạt hóa sự tiêu diệt (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), MHC lớp I hoặc II, NKG2a, NKG2d, OX40 (CD134), OX40L (CD134L), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2), và/hoặc VISTA (PD-1H), mà được biểu hiện trên các tế bào lympho T, tế bào giết tự nhiên (NK), các tế bào trình diện kháng nguyên hoặc tế bào đơn nhân khác. Cụ thể, vị trí liên kết epitop đã được định hướng đến thụ thể bề mặt tế bào mà có liên quan đến việc điều hòa điểm kiểm tra miễn dịch (hoặc phối tử của nó) là hữu ích để tạo ra các phân tử liên kết đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu mà

làm đối kháng hoặc phong bế việc truyền tín hiệu ức chế của các phân tử điểm kiểm tra miễn dịch và nhờ đó kích thích, điều hòa tăng hoặc tăng cường, các đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Các phân tử có liên quan đến việc điều hòa các điểm kiểm tra miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC lớp I hoặc II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 và/hoặc VISTA.

Tuy nhiên, các ưu điểm nêu trên lại kéo theo chi phí đáng kể. Việc tạo thành các kháng tổ hợp kép không đơn đặc hiệu như vậy đòi hỏi phải lắp ráp thành công hai hoặc nhiều hơn hai polypeptit riêng biệt và khác nhau (nghĩa là, sự tạo thành như vậy đòi hỏi rằng các kháng tổ hợp kép phải được tạo ra thông qua sự heterodime hóa của các loại chuỗi polypeptit khác nhau). Thực tế này trái ngược với các kháng tổ hợp kép đơn đặc hiệu, mà được tạo ra thông qua sự homodime hóa của các chuỗi polypeptit giống nhau. Do ít nhất hai polypeptit không giống nhau (nghĩa là, hai loại polypeptit) phải được cung cấp để tạo ra kháng tổ hợp kép không đặc hiệu đơn, và do sự homodime hóa của các polypeptit này tạo ra các phân tử bất hoạt (Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System",* Protein Eng. 13(8):583-588), việc sản xuất các polypeptit như vậy phải được hoàn thành theo cách này để ngăn chặn sự liên kết cộng hóa trị giữa các polypeptit của cùng loài (nghĩa là, để ngăn chặn sự homodime hóa) (Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System",* Protein Eng. 13(8):583-588). Do đó tình trạng kỹ thuật nêu ra sự liên kết không cộng hóa trị của các polypeptit như vậy (xem, ví dụ, Olafsen *et al.* (2004) *"Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications",* Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano *et al.* (2004) "*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System",* Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. *et al.* (2005) "*A Fully Human*

*Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Tuy nhiên, tình trạng kỹ thuật cũng nhận ra rằng các kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép gồm các polypeptit được liên kết không cộng hóa trị là không ổn định và dễ dàng phân ly thành các monome không có chức năng (xem, ví dụ, Lu, D. *et al.* (2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Đối diện với thử thách này, tình trạng kỹ thuật đã thành công phát triển được các kháng tổ hợp kép không đặc hiệu đơn heterodime được liên kết cộng hóa trị, ổn định, được gọi là các kháng tổ hợp kép DART® (chất phản ứng hướng đích lại có ái lực kép); xem, ví dụ, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2013-0295121; 2010-0174053 và 2009-0060910; Công bố đơn xin cấp patent châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 và công bố đơn quốc tế số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; WO 2008/157379; WO 2006/113665 và Sloan, D.D. *et al.* (2015) "*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells*", PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. *et al.* (2015) "*Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform*", Blood 127(1):122-131; Chichili, G.R. *et al.* (2015) "*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates*", Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. *et al.* (2011) "*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. *et al.* (2010) "*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold*", Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. *et al.* (2010) "*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion*", J. Mol. Biol.

399(3):436-449; Marvin, J.S. *et al.* (2005) *"Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibody",* Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658; Olafsen, T. *et al.* (2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Holliger, P. *et al.* (1993) "'*Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments",* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448. Các kháng tổ hợp kép này bao gồm hai hoặc nhiều hơn hai polypeptit được tạo phức cộng hóa trị và liên quan đến việc xử lý kỹ thuật một hoặc nhiều gốc xystein thành mỗi trong số các loại polypeptit được sử dụng mà cho phép liên kết disulfua tạo ra và nhờ đó liên kết cộng hóa trị hai chuỗi polypeptit. Ví dụ, việc bổ sung gốc xystein vào đầu tận C của các cấu trúc này được cho thấy là cho phép liên kết disulfua giữa các chuỗi polypeptit, làm ổn định heterodime tạo thành mà không cản trở đặc tính liên kết của phân tử hai giá.

Mỗi trong số hai polypeptit của kháng tổ hợp kép DART® đặc hiệu kép đơn giản nhất bao gồm ba miền. Polypeptit thứ nhất bao gồm (theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C): (i) miền thứ nhất bao gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thứ nhất (VL1), (ii) miền thứ hai bao gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch thứ hai (VH2), và (iii) miền thứ ba chứa gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) và miền kích thích heterodime mà nhằm để kích thích sự heterodime hóa với polypeptit thứ hai của kháng tổ hợp kép và liên kết cộng hóa trị polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai của kháng tổ hợp kép với nhau. Polypeptit thứ hai chứa (theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C): (i) miền thứ nhất bao gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thứ hai (VL2), (ii) miền thứ hai bao gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch thứ nhất (VH1), và (iii) miền thứ ba chứa gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) và miền kích thích heterodime bổ trợ mà tạo phức với miền kích thích heterodime của chuỗi polypeptit thứ nhất để kích thích sự heterodime hóa với chuỗi polypeptit thứ nhất. Gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) của miền thứ ba của chuỗi polypeptit thứ hai nhằm để kích thích sự liên kết cộng hóa trị của chuỗi polypeptit thứ hai với chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng tổ hợp kép. Các phân tử này ổn định, hoạt lực và có khả năng liên kết đồng thời hai hoặc nhiều hơn hai kháng nguyên.

Theo một phương án, các miền thứ ba của thứ nhất và polypeptit thứ hai, mỗi miền chứa một gốc xystein, mà nhằm để liên kết các polypeptit cùng nhau thông qua liên kết disulfua. Fig. 1 mô tả sơ đồ của kháng tổ hợp kép như vậy, sử dụng miền kích thích heterodime vòng xoắn E/vòng xoắn K và tác nhân liên kết chứa xystein để liên kết cộng hóa trị. Như được thể hiện trên Fig. 2 và các hình vẽ từ Fig. 3A đến Fig. 3C, một hoặc cả hai polypeptit có thể còn mang trình tự của miền CH2-CH3, để tạo phức giữa hai kháng tổ hợp kép polypeptit tạo ra vùng Fc mà có khả năng liên kết với thụ thể Fc của các tế bào (như tế bào lympho B, tế bào đuôi gai, tế bào giết tự nhiên, các đại thực bào, bạch cầu trung tính, tế bào ưa eosin, bạch cầu ưa kiềm và tế bào mast). Như được đề cập chi tiết hơn dưới đây, các miền CH2 và/hoặc CH3 của các chuỗi polypeptit này cần phải không giống hệt nhau về trình tự, và thuận lợi là được cải biến để tạo điều kiện cho việc tạo phức giữa hai chuỗi polypeptit đó.

Nhiều biến thể của các phân tử như vậy đã được mô tả (xem, ví dụ, Công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053 và 2009/0060910; Công bố đơn xin cấp patent châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 và công bố đơn quốc tế số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Các kháng tổ hợp kép DART® chứa vùng Fc này có thể bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit. Chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm (theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C): (i) miền thứ nhất bao gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thứ nhất (VL1), (ii) miền thứ hai bao gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch thứ hai (VH2), (iii) miền thứ ba chứa gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) và nhằm để kích thích sự heterodime hóa với polypeptit thứ hai của kháng tổ hợp kép và liên kết cộng hóa trị polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai của kháng tổ hợp kép với nhau, và (iv) miền CH2-CH3. Polypeptit thứ hai chứa (theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C): (i) miền thứ nhất bao gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thứ hai (VL2), (ii) miền thứ hai bao gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch thứ nhất (VH1), và (iii)) miền thứ ba chứa gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) và miền kích thích heterodime mà kích thích sự heterodime hóa với chuỗi polypeptit thứ nhất. Ở đây, hai polypeptit thứ nhất tạo phức với nhau để tạo ra vùng Fc. Các hình vẽ từ Fig.

3A đến Fig. 3C mô tả các sơ đồ về ba biến thể của các kháng tổ hợp kép này sử dụng các miền kích thích heterodime khác nhau.

Các kháng tổ hợp kép DART® chứa vùng Fc khác có thể bao gồm ba chuỗi polypeptit. Polypeptit thứ nhất của các kháng tổ hợp kép DART® này chứa ba miền: (i) miền chứa VL1, (ii) miền chứa VH2 và (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3. Polypeptit thứ hai của các kháng tổ hợp kép DART® này chứa: (i) miền chứa VL2, (ii) miền chứa VH1 và (iii) miền kích thích heterodime hóa và liên kết cộng hóa trị với chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng tổ hợp kép. Polypeptit thứ ba của các kháng tổ hợp kép DART® này bao gồm trình tự CH2-CH3. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của các kháng tổ hợp kép DART® này kết hợp cùng nhau để tạo ra vị trí liên kết VL1/VH1 có khả năng liên kết với epitop, cũng như vị trí liên kết VL2/VH2 mà có khả năng liên kết với epitop thứ hai. Các phân tử DART® phức tạp hơn cũng mang miền chứa xystein mà chức hóa để tạo ra phức hợp được liên kết cộng hóa trị. Do đó, polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau thông qua liên kết disulfua bao gồm các gốc xystein trong các miền thứ ba tương ứng của chúng. Đáng chú ý là, các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với nhau để tạo ra vùng Fc mà được làm ổn định thông qua liên kết disulfua. Các hình vẽ từ Fig. 4A đến Fig. 4B mô tả các sơ đồ về các kháng tổ hợp kép bao gồm ba chuỗi polypeptit như vậy.

Các kháng tổ hợp kép DART® chứa vùng Fc khác nữa có thể bao gồm năm chuỗi polypeptit mà có thể chứa các vùng liên kết từ các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của lên đến ba globulin miễn dịch khác nhau (được đề cập đến là VL1/VH1, VL2/VH2 và VL3/VH3). Ví dụ, chuỗi polypeptit thứ nhất của các kháng tổ hợp kép này có thể chứa: (i) miền chứa VH1, (ii) miền chứa CH1, và (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của các kháng tổ hợp kép như vậy có thể chứa: (i) miền chứa VL1, và (ii) miền chứa CL. Chuỗi polypeptit thứ ba của các kháng tổ hợp kép như vậy có thể chứa: (i) miền chứa VH1, (ii) miền chứa CH1, (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3, (iv) miền chứa VL2, (v) miền chứa VH3 và (vi) miền kích thích heterodime, trong đó các miền kích thích heterodime này kích thích sự heterodime hóa của chuỗi thứ ba với chuỗi thứ tư. Polypeptit thứ tư của các kháng tổ hợp kép này có thể chứa: (i) miền chứa VL3, (ii) miền chứa VH2

và (iii) miền kích thích sự heterodime hóa và liên kết cộng hóa trị với chuỗi polypeptit thứ ba của kháng tổ hợp kép. Ở đây, các polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với nhau để tạo ra vùng Fc. Các phân tử DART® phức tạp hơn này cũng mang miền chứa xystein mà chức hóa để tạo ra phức hợp được liên kết cộng hóa trị, để cho mỗi chuỗi polypeptit được liên kết với ít nhất một chuỗi polypeptit bổ sung thông qua liên kết disulfua bao gồm các gốc xystein. Tốt hơn là, các miền này được xếp theo thứ tự theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C. Fig. 5 thể hiện các sơ đồ về các kháng tổ hợp kép bao gồm năm chuỗi polypeptit như vậy.

Các cấu trúc thay thế là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật đối với các ứng dụng trong đó phân tử ba giá được mong đợi như Fc thì không cần thiết bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể nối tiếp bốn giá, còn được đề cập đến là "TandAbs" (xem, ví dụ, Công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; Công bố đơn xin cấp patent châu Âu số EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 và EP 1293514; Công bố đơn quốc tế số WO 1999/057150, WO 2003/025018, và WO 2013/013700) mà được tạo ra bằng cách homodime hóa hai chuỗi giống hệt nhau mỗi chuỗi mang miền VH1, VL2, VH2, và VL2.

Mới đây, các cấu trúc ba giá kết hợp hai miền liên kết kiểu kháng tổ hợp kép và một miền kiểu không phải kháng tổ hợp kép và vùng Fc đã được mô tả (xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số: PCT/US15/33076, có tiêu đề "Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof", được nộp vào ngày 29 tháng 5 năm 2015; và PCT/US15/33081, có tiêu đề "Tri-Specific Binding Molecules That Specifically Bind to Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof", được nộp vào ngày 29 tháng 5 năm 2015). Các phân tử ba giá này có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu ba. Các hình vẽ từ Fig. 6A đến Fig. 6F mô tả các sơ đồ về các phân tử ba giá này bao gồm 3 hoặc 4 chuỗi polypeptit.

IV. Các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế

Các phân tử liên kết LAG-3 được ưu tiên theo sáng chế bao gồm các kháng thể, các kháng tổ hợp kép, BiTE, *v.v.* và có khả năng liên kết với phần liên tục hoặc không liên tục (ví dụ, cấu hình) (epitop) của LAG-3 ở người. Các phân tử liên kết

LAG-3 theo sáng chế tốt hơn là cũng sẽ có khả năng liên kết với các phân tử LAG-3 của một hoặc nhiều loài không phải người, cụ thể là, loài động vật linh trưởng (và đặc biệt là loài động vật linh trưởng, như khỉ đầu chó). Polypeptit LAG-3 ở người đại diện (trình tự NCBI NP_002277.4; bao gồm trình tự tín hiệu 22 gốc axit amin (được thể hiện bằng đường gạch chân) và protein thuần thục 503 gốc axit amin) có trình tự axit amin (SEQ ID NO:5):

```
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
```

Theo các phương án nhất định, các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế được mô tả bằng (một hoặc nhiều) tiêu chuẩn bất kỳ trong số các tiêu chuẩn sau:

(1) liên kết đặc hiệu với LAG-3 ở người khi được biểu hiện nội sinh trên bề mặt của tế bào T ở người đã được kích thích;

(2) liên kết đặc hiệu với LAG-3 ở người với hằng số liên kết cân bằng ($K_D$) bằng 40 nM hoặc nhỏ hơn;

(3) liên kết đặc hiệu với LAG-3 ở người với hằng số liên kết cân bằng ($K_D$) bằng 0,5 nM hoặc nhỏ hơn;

(4) liên kết đặc hiệu với LAG-3 ở động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, LAG-3 của khỉ đầu chó);

(5) liên kết đặc hiệu với LAG-3 ở động vật linh trưởng không phải người với hằng số liên kết cân bằng ($K_D$) bằng 50 nM hoặc nhỏ hơn;

(6) liên kết đặc hiệu với LAG-3 ở động vật linh trưởng không phải người với hằng số liên kết cân bằng ($K_D$) bằng 5 nM hoặc nhỏ hơn;

(7) ức chế (nghĩa là, phong bế hoặc cản trở) sự liên kết của LAG-3 với MHC lớp II;

(8) kích thích đáp ứng miễn dịch;

(9) kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên dưới dạng một chất;

(10) hiệp đồng với kháng thể kháng PD-1 để kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên;

(11) liên kết cùng một epitop của LAG-3 là kháng thể LAG-3 mAb 1 hoặc LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3 và/hoặc

(12) không cạnh tranh với kháng thể 257F kháng LAG-3 (BMS 986016, Medarex/BMS) để liên kết LAG-3 (ví dụ, như được đo bằng phép phân tích Biacore).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên" dùng để chỉ các đáp ứng bởi tế bào T do sự kích thích tế bào T bằng kháng nguyên mà tế bào T này là đặc hiệu. Các ví dụ không giới hạn về các đáp ứng bởi tế bào T khi kích thích đặc hiệu kháng nguyên bao gồm sự tăng sinh và sự sản sinh xytokin (ví dụ, sự sản sinh TNF-α, IFN-γ). Khả năng của một phân tử trong việc kích thích các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu kháng nguyên có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm PBMC được kích thích bởi kháng nguyên nội độc tố loại B *Staphylococcus aureus* ("SEB") được mô tả ở đây.

Các phân tử liên kết LAG-3 được ưu tiên theo sáng chế mang các miền VH và/hoặc VL của các kháng thể đơn dòng kháng LAG-3 ở chuột "LAG-3 mAb 1", "LAG-3 mAb 2", "LAG-3 mAb 3", "LAG-3 mAb 4", "LAG-3 mAb 5", và/hoặc "LAG-3 mAb 6" và tốt hơn nữa là mang 1, 2 hoặc tất cả 3 trong số các $CDR_H$ của miền VH và/hoặc 1, 2 hoặc tất cả 3 trong số các $CDR_L$ của miền VL của các kháng thể đơn dòng kháng LAG-3 này. Các phân tử liên kết LAG-3 được ưu tiên này bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép (hoặc đa đặc hiệu), kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người, BiTe, các kháng tổ hợp kép, *v.v.*, và các phân tử liên kết có các vùng Fc biến thể như vậy.

Sáng chế đề cập đến cụ thể các phân tử liên kết LAG-3 bao gồm miền liên kết LAG-3 mang:

(A) (1) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 1, hoặc hLAG-3 mAb 1 VL4 kháng LAG-3;

(2) ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3;

(3) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3 và ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3;

(4) miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3;

(5) miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3;

(6) các miền VH và VL của kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3;

(B) (1) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 2 kháng LAG-3;

(2) ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 2 kháng LAG-3;

(3) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 2 kháng LAG-3 và ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 2 kháng LAG-3;

(4) miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 2 kháng LAG-3;

(5) miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 2 kháng LAG-3;

(6) các miền VH và VL của kháng thể LAG-3 mAb 2 kháng LAG-3;

(C) (1) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 3 kháng LAG-3;

(2) ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 3 kháng LAG-3;

(3) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 3 kháng LAG-3 và ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 3 kháng LAG-3;

(4) miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 3 kháng LAG-3;

(5) miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 3 kháng LAG-3;

(6) các miền VH và VL của kháng thể LAG-3 mAb 3 kháng LAG-3;

(D) (1) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 4 kháng LAG-3;

(2) ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 4 kháng LAG-3;

(3) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 4 kháng LAG-3 và ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 4 kháng LAG-3;

(4) miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 4 kháng LAG-3;

(5) miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 4 kháng LAG-3;

(6) các miền VH và VL của kháng thể LAG-3 mAb 4 kháng LAG-3;

(E) (1) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 5 kháng LAG-3;

(2) ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 5 kháng LAG-3;

(3) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 5 kháng LAG-3 và ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 5 kháng LAG-3;

(4) miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 5 kháng LAG-3;

(5) miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 5 kháng LAG-3;

(6) các miền VH và VL của kháng thể LAG-3 mAb 5 kháng LAG-3;

(F) (1) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3;

(2) ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3;

(3) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3 và ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3;

(4) miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3;

(5) miền VL của kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3;

(6) các miền VH và VL của kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3,

(G) (1) ba $CDR_L$ của miền VL của kháng thể hLAG-3 mAb 1 VL4 kháng LAG-3;

(2) ba $CDR_H$ của miền VH của kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3 và ba CDR của miền VL của kháng thể hLAG-3 mAb 1 VL4 kháng LAG-3;

hoặc

liên kết hoặc cạnh tranh để liên kết với, epitop mà LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5 hoặc LAG-3 mAb 6 liên kết theo cách đặc hiệu miễn dịch.

A. Kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3

1. Kháng thể LAG-3 mAb 1 của chuột kháng LAG-3 ở người

Trình tự axit amin của miền VH của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:6) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới).

```
QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFR NYGMNWVKQA PGKVLKWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFAF SLGTSASTAY LQINILKNED TATYFCARES
LYDYYSMDYW GQGTSVTVSS
```

$CDR_H1$ của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:8): NYGMN

$CDR_H2$ của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:9): WINTYTGESTYADDFEG

$CDR_H3$ của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:10): ESLYDYYSMDY

Polynucleotit nêu làm ví dụ mã hóa miền VH của LAG-3 mAb 1 là SEQ ID NO:7 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
cagatccagt tggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac
agtcaagatc tcctgcaagg cttctgggta taccttcaga aactatggaa
tgaactgggt gaagcaggct ccaggaaagg ttttaaagtg gatgggctgg
ataaacacct acactggaga gtcaacatat gctgatgact tcgagggacg
gtttgccttc tctttgggaa cctctgccag cactgcctat ttgcagatca
acatcctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagaatcc
ctctatgatt actattctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac
cgtctcctca
```

Trình tự axit amin của miền VL của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:11) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE
RLIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKLE IK
```

$CDR_L1$ của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:13): KSSQSLLHSDGKTYLN

$CDR_L2$ của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:14): LVSELDS

$CDR_L3$ của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:15): WQGTHFPYT

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VL của LAG-3 mAb 1 là SEQ ID NO:12 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gatgttgtgg tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca
accagcctcc atctcttgca agtcaagtca gagcctctta catagtgatg
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccagag
cgcctaatct atctggtgtc tgaactggac tctggagtcc ctgacaggtt
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg
aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa

2. Làm cho kháng thể LAG-3 mAb 1 kháng LAG-3 giống như của người để tạo ra "hLAG-3 mAb 1"

Kháng thể LAG-3mAb 1 kháng LAG-3 ở chuột được mô tả ở trên được làm giống như của người để chứng minh khả năng làm cho kháng thể kháng LAG-3 giống như của người để làm giảm tính kháng nguyên của nó khi sử dụng cho người nhận. Việc làm cho giống như của người tạo ra hai miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu ở đây là "hLAG-3 mAb 1 VH-1", và "hLAG-3 mAb 1 VH-2", và bốn miền VL được làm giống như của người được ký hiệu ở đây là "hLAG-3 mAb 1 VL-1", "hLAG-3 mAb 1 VL-2", "hLAG-3 mAb 1 VL-3", và "hLAG-3 mAb 1 VL-4". Miền bất kỳ trong số các miền VL được làm giống như của người có thể được bắt cặp với các miền VH được làm giống như của người. Do đó, kháng thể bất kỳ chứa một trong số các miền VL được làm giống như của người được bắt cặp với miền VH được làm giống như của người được đề cập chung đến là "hLAG-3 mAb 1", và các tổ hợp cụ thể của các miền VH/VL được làm giống như của người được đề cập bằng cách viện dẫn miền VH/VL đặc hiệu, ví dụ, kháng thể được làm giống như của người bao gồm hLAG-3 mAb 1 VH-1 và hLAG-3 mAb 1 VL-2 được đề cập cụ thể đến dưới dạng "hLAG-3 mAb 1(1.2)".

Trình tự axit amin của miền VH của hLAG-3 mAb 1 VH-1 (SEQ ID NO:16) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 1 VH-1 là SEQ ID NO:17 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
caggtgcaac tggttcaatc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgcctc
cgtgaaagtg tcctgtaagg catctgggta tacgttcaca aattatggta
tgaactgggt gcgacaggca ccagggcagg gactggaatg gatggggtgg
atcaatactt atacaggcga gagtacttat gctgacgatt tcgagggcag
atttgtcttc tccatggaca ccagcgctag taccgcttat ctccagatta
gttctctcaa ggcggaggac acagctgttt attattgtgc ccgcgagagt
ttgtatgact actatagcat ggattactgg ggacaaggta caaccgtgac
agtgagttcc
```

Trình tự axit amin của miền VH của hLAG-3 mAb 1 VH-2 (SEQ ID NO:18) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYFCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS
```

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 1 VH-2 là SEQ ID NO:19 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
caggtgcaac tggttcaatc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgcctc
cgtgaaagtg tcctgtaagg catctgggta tacgttcaca aattatggta
tgaactgggt gcgacaggca ccagggcagg gactggaatg gatggggtgg
atcaatactt atacaggcga gagtacttat gctgacgatt tcgagggcag
atttgtcttc tccatggaca ccagcgctag taccgcttat ctccagatta
gttctctcaa ggcggaggac acagctgttt atttctgtgc ccgcgagagt
ttgtatgact actatagcat ggattactgg ggacaaggta caaccgtgac
agtgagttcc
```

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL-1 (SEQ ID NO:20) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK
```

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 1 VL-1 là SEQ ID NO:21 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
gatatcgtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca
gcccgctagt atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactgg cttctgcaga aaccaggcca aagtccagag
agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
aggccgagga cgtcggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttccct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa
```

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL-2 (SEQ ID NO:22) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 1 VL-2 là SEQ ID NO:23 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gatatcgtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca
gcccgctagt atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactgg cttctgcaga gaccaggcca aagtccagag
agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
aggccgagga cgtcggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttccct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL-3 (SEQ ID NO:24) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 1 VL-3 là SEQ ID NO:25 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gatatcgtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca
gcccgctagt atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
gaaagaccta tttgaactgg cttctgcaga aaccaggcca accgccagag
agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
aggccgagga cgtcggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttccct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL-4 (SEQ ID NO:26) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 1 VL-4 là SEQ ID NO:27 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gatatcgtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca
gcccgctagt atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg
caaagaccta tttgaactgg cttctgcaga aaccaggcca accgccagag
agattgatct acctcgtttc agaactcgac agtggagtgc ccgatcgctt
ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc tcaagagtgg
aggccgagga cgtcggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttccct
tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa

$CDR_L1$ của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL-4 bao gồm đoạn thay thế axit amin từ glyxin sang alanin và có trình tự axit amin: KSSQSLLHSDAKTYLN (SEQ ID NO:28), alanin đã thay thế được thể hiện bằng cách gạch dưới). Dự tính rằng đoạn thay thế tương tự có thể được kết hợp vào miền bất kỳ trong số các miền $CDR_L1$ của LAG-3 mAb 1 được mô tả ở trên.

B. Kháng thể LAG-3 mAb 2 kháng LAG-3

Trình tự axit amin của miền VH của LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:29) được thể hiện dưới đây (gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DYNIHWLRQS HGESLEWIGY
IYPYSGDIGY NQKFKNRATL TVDNSSSTAY MDLRSLTSED SAVFYCARWH
RNYFGPWFAY WGQGTPVTVS A
```

$CDR_H1$ của LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:31): DYNIH

VH $CDR_H2$ của LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:32): YIYPYSGDIGYNQKFKN

VH $CDR_H3$ của LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:33): WHRNYFGPWFAY

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VH của LAG-3 mAb 2 là SEQ ID NO:30 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
agtgaagatt tcctgcaaga cttctggata cacatttact gactacaaca
tacactggtt gaggcagagc catggagaga gccttgagtg gattggatat
atttatcctt acagtggtga tattggatac aaccagaagt tcaagaacag
ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggatctcc
gcagcctgac atctgaagac tctgcagtct tttactgtgc aagatggcac
aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactccggt
cactgtctct gca
```

Trình tự axit amin của miền VL của LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:34) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGESYMNWY QQKPGQPPKL
LIYVVSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSSEDPL
TFGAGTKLEL K
```

$CDR_L1$ của LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:36): KASQSVDYDGESYMN

$CDR_L2$ của LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:37): VVSNLES

$CDR_L3$ của LAG-3 mAb 2 (SEQ ID NO:38): QQSSEDPLT

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VL của LAG-3 mAb 2 là SEQ ID NO:35 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
aaagttatat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
ctcatttatg ttgtatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

C. Kháng thể LAG-3 mAb 3 kháng LAG-3

Trình tự axit amin của miền VH của LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:39) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

EVRLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYNIHWVRQS HGQSLEWIGY
IYPYNGDTGY NQKFKTKATL TVDNSSNTAY MELRSLASED SAVYYCTRWS
RNYFGPWFAY WGQGTLVTVS A

$CDR_H1$ của LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:41): DYNIH

$CDR_H2$ của LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:42): YIYPYNGDTGYNQKFKT

$CDR_H3$ của LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:43): WSRNYFGPWFAY

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VH của LAG-3 mAb 3 là SEQ ID NO:40 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gaggtccggc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
agtgaagata tcctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca
ttcactgggt gaggcagagc catggacaga gccttgagtg gattggatat
atttatcctt ataatggtga tactggctac aaccagaagt tcaagaccaa
ggccacattg actgtagaca attcctccaa cacagcctac atggaactcc
gcagcctggc atctgaagac tctgcagtct attactgtac aagatggagc
aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
cactgtctct gca

Trình tự axit amin của miền VL của LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:44) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

DIVLTQSPTS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGQPPKL
LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSSEDPL
TFGAGTKLEL K

$CDR_L1$ của LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:46): KASQSVDYDGDSYMN

$CDR_L2$ của LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:47): AASNLES

$CDR_L3$ của LAG-3 mAb 3 (SEQ ID NO:48): QQSSEDPLT

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VL của LAG-3 mAb 3 là SEQ ID NO:45 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
gacattgtgc tgacccaatc tccaacttct ttggctgtgt ctctagggca
gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
atagttatat gaactggtat caacagaaac caggacagcc acccaaactc
ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa
```

D. Kháng thể LAG-3 mAb 4 kháng LAG-3

Trình tự axit amin của miền VH của LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:49) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
EVQLHQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DYNIHWVKQS HGKSLEWIGY
IYPYNGDAGY NQNFKTKATL TVDNSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARWN
MNYFGPWFAY WGQGTLVTVS A
```

$CDR_H1$ của LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:51): DYNIH

$CDR_H2$ của LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:52): YIYPYNGDAGYNQNFKT

$CDR_H3$ của LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:53): WNMNYFGPWFAY

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VH của LAG-4 mAb 4 là SEQ ID NO:50 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
gaggtccagc ttcaccagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
agtgaagata tcctgcaaga cttctggata cactttcact gactacaaca
tacactgggt gaagcagagc catggaaaga gccttgagtg gattggatat
atttatcctt acaatggtga tgctggctac aaccagaact tcaagaccaa
ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggagctcc
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatggaac
atgaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
cactgtctct gcg
```

Trình tự axit amin của miền VL của LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:54) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGVTYINWY QQKPGQPPKL
LIFAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSNEDPL
TFGAGTKLEL K
```

$CDR_L1$ của LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:56): KASQSVDYDGVTYIN

$CDR_L2$ của LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:7570): AASNLES

$CDR_L3$ của LAG-3 mAb 4 (SEQ ID NO:58): QQSNEDPLT

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VL của LAG-3 mAb 4 là SEQ ID NO:55 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
ttacttatat caactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
ctcatctttg ctgcatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgctc
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa
```

E. Kháng thể LAG-3 mAb 5 kháng LAG-3

Trình tự axit amin của miền VH của LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:59) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYNIHWVKQS PGKSLEWIGY
IYPYSGDFGY NQKFKSKATL TVDNSSSTAY MDLRSLTSED SAVFYCARWH
RNYFGPWFAY WGQGTLVTVS A
```

$CDR_H1$ của LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:61): DYNIH

$CDR_H2$ của LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:62): YIYPYSGDFGYNQKFKS

$CDR_H3$ của LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:63): WHRNYFGPWFAY

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VH của LAG-3 mAb 5 là SEQ ID NO:60 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc
agtgaagatt tcctgcaaag cttctggata cacatttact gactacaaca
tacactgggt gaagcagagc cctggaaaga gccttgaatg gattggatat
atttatcctt acagtggtga ttttggatac aaccagaagt tcaagagcaa
ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac atggatctcc
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct tttactgtgc aagatggcac
aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt
cactgtctct gca
```

Trình tự axit amin của miền VL của LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:64) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGESYMNWY QQKPGQPPKL
LIYVVSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSSEDPL
TFGAGTKLEL K
```

$CDR_L1$ của LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:66): KASQSVDYDGESYMN

$CDR_L2$ của LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:67): VVSNLES

$CDR_L3$ của LAG-3 mAb 5 (SEQ ID NO:68): QQSSEDPLT

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VL của LAG-3 mAb 5 là SEQ ID NO:65 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg
aaagttatat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc
ctcatttatg ttgtttccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg
aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa

F. Kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3

1. Kháng thể LAG-3 mAb 6 của chuột kháng LAG-3 ở người

Trình tự axit amin của miền VH của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:69) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD
INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAREA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

$CDR_H1$ của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:71): DYNMD

$CDR_H2$ của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:72): DINPDNGVTIYNQKFEG

$CDR_H3$ của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:72): EADYFYFDY

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VH của LAG-3 mAb 6 là SEQ ID NO:70 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc
agtgaagata ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca
tggactgggt gaagcagagc catggagaga gccttgagtg gattggagat
attaatcctg acaatggtgt tactatctac aaccagaagt ttgagggcaa
ggccacactg actgtagaca agtcctccag tacagcctac atggagctcc
gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagaggcg
gattacttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc
ctca

Trình tự axit amin của miền VL của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:74) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS SVVAWYQQKP GQSPKLLIFS
ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIK

$CDR_L1$ của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:76): KASQDVSSVVA

$CDR_L2$ của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:77): SASYRYT

$CDR_L3$ của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:78): QQHYSTPWT

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa miền VL của LAG-3 mAb 6 là SEQ ID NO:75 (nucleotit mã hóa các CDR được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
gacattgtga tgacccagtc tcacagattc atgtccacat cagttggaga
cagggtcagc atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt tctgttgtag
cctggtatca acagaaacca ggacaatctc ctaaattact gatttttcg
gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat cgcttcactg gcagtggatc
tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct gcagacctgg
cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcggtgga
ggcaccaagc tggaaatcaa a
```

2. Làm cho kháng thể LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3 giống như của người để tạo ra "hLAG-3 mAb 6"

Kháng thể LAG-3mAb 6 kháng LAG-3 ở chuột được mô tả ở trên được làm giống như của người để chứng minh khả năng làm cho kháng thể kháng LAG-3 giống như của người để làm giảm tính kháng nguyên khi sử dụng cho người nhận. Việc làm cho giống như của người tạo ra hai miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu ở đây là "hLAG-3 mAb 6 VH-1", và "hLAG-3 mAb 6 VH-2", và hai miền VL được làm giống như của người được ký hiệu ở đây là "hLAG-3 mAb 6 VL-1", và "hLAG-3 mAb 6 VL-2". Miền bất kỳ trong số các miền VL được làm giống như của người có thể được bắt cặp với các miền VH được làm giống như của người. Theo đó, kháng thể bất kỳ mà bao gồm một trong số các miền VL được làm giống như của người VL đã bắt cặp với miền VH được làm giống như của người được đề cập chung là "hLAG-3 mAb 6", và các tổ hợp cụ thể của các miền VH/VL được làm giống như của người được đề cập bằng cách viện dẫn đến các miền VH/VL cụ thể, ví dụ, kháng thể được làm giống như của người bao gồm hLAG-3 mAb 6 VH-1 và hLAG-3 mAb 6 VL-2 được đề cập đến một cách cụ thể là "hLAG-3 mAb 6(1.2)".

Trình tự axit amin của miền VH của hLAG-3 mAb 6 VH-1 (SEQ ID NO:79) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMGD INPDNGVTIY
NQKFEGRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREA DYFYFDYWGQ GTTLTVSS
```

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 6 VH-1 là SEQ ID NO:80 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

```
caggtccagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcaag cgtgaaggtg
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacaaca tggactgggt ccgacaggcc
```

ccaggacagg gcctggaatg gatgggcgac atcaaccccg acaacggcgt gaccatctac
aaccagaaat tcgagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac
atggaactgc ggtccctgcg gagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagaggcc
gactacttct acttcgacta ctggggccag ggcaccaccc tgaccgtgtc ctcc

Trình tự axit amin của miền VH của hLAG-3 mAb 6 VH-2 (SEQ ID NO:81) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGKGLEWVSD INPDNGVTIY
NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREA DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 6 VH-2 là SEQ ID NO:82 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gaggtccagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcggcag cctgagactg
agctgcgctg ccagcggctt caccttcagc gactacaaca tggactgggt ccgacaggcc
cctggcaagg gcctggaatg ggtgtccgac atcaaccccg acaacggcgt gaccatctac
aaccagaagt tcgagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagaggcc
gactacttct acttcgacta ctggggccag ggcaccaccc tgaccgtgtc ctcc

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 6 VL-1 (SEQ ID NO:83) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG GTKLEIK

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 6 VL-1 là SEQ ID NO:84 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
atcacctgtc gggccagcca ggatgtgtcc agcgtggtgg cctggtatca gcagaagccc
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacacagg cgtgcccagc
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag cactacagca ccccctggac cttcggcgga
ggcaccaagc tggaaatcaa g

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 6 VL-2 (SEQ ID NO:85) được thể hiện dưới đây (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPD
RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG GTKLEIK

Polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa hLAG-3 mAb 6 VL-2 là SEQ ID NO:86 (nucleotit mã hóa các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch dưới):

gacatcgtga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
atcacctgtc gggccagcca ggatgtgtcc agcgtggtgg cctggtatca gcagaagccc
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacacagg cgtgcccgat
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc
gaggacatcg ccgtttacta ctgccagcag cactacagca ccccctggac cttcggcgga
ggcaccaagc tggaaatcaa g

$CDR_L1$ của miền VL của hLAG-3 mAb 2 VL-1 và VL-2 bao gồm đoạn thay thế axit amin từ lysin sang arginin và có trình tự axit amin: RASQDVSSVVA (SEQ ID NO:87), arginin đã thay thế được thể hiện bằng cách gạch dưới). Dự tính rằng đoạn thay thế tương tự có thể được kết hợp vào miền bất kỳ trong số các miền $CDR_L1$ của LAG-3 mAb 6 được mô tả ở trên.

Các thay đổi nhỏ đối với trình tự axit amin của các miền VH và/hoặc VL được đề cập ở đây cũng được bao gồm. Ví dụ, gốc axit amin đầu tận C của miền bất kỳ trong số các miền VH và/hoặc VL được mô tả ở đây có thể được thay thế để tạo thuận lợi cho việc tách dòng phụ.

V. Các kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, và/hoặc LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3 và các dẫn xuất của chúng có vùng Fc đã được xử lý kỹ thuật

Trong chức năng miễn dịch truyền thống, sự tương tác của các phức hợp kháng thể-kháng nguyên với các tế bào của hệ thống miễn dịch tạo ra một loạt các đáp ứng khác nhau, từ các chức năng tác động như tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, sự mất hạt nhỏ của tế bào mast, sự thực bào đến các tín hiệu điều biến miễn dịch như điều hòa sự tăng sinh tế bào lympho và sự bài tiết kháng thể. Tất cả các tương tác này được khởi đầu thông qua sự liên kết của vùng Fc của các kháng thể hoặc các phức hợp miễn dịch với các thụ thể bề mặt tế bào chuyên biệt trên các tế bào tạo máu. Tính đa dạng của các đáp ứng tế bào được kích hoạt bởi các kháng thể và các phức hợp miễn dịch là do sự không đồng nhất về cấu trúc của ba thụ thể Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) và FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) và FcγRIII (CD16) là các thụ thể hoạt hóa (nghĩa là, làm tăng cường hệ miễn dịch); FcγRIIB (CD32B) là một thụ thể ức chế (nghĩa là, làm suy yếu hệ miễn dịch). Ngoài ra, sự tương tác với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) điều tiết sự tái sinh của các phân tử IgG từ hạt cơ quan nội bào đến bề mặt tế bào và giải phóng vào máu. Trình tự axit amin của IgG1 được nêu làm ví dụ (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 2), IgG3 (SEQ ID NO: 3) và IgG4 (SEQ ID NO: 4).

Sự cải biến của vùng Fc thường tạo ra kiểu hình biến đổi, ví dụ, thời gian bán thải của huyết thanh biến đổi, độ ổn định biến đổi, độ nhạy cảm với các enzyme tế

bào biến đổi hoặc chức năng tác động biến đổi. Có thể mong muốn là cải biến được kháng thể hoặc phân tử liên kết khác của sáng chế về chức năng tác động, ví dụ, để tăng cường hiệu quả của phân tử như vậy trong điều trị bệnh ung thư. Việc làm giảm hoặc loại bỏ chức năng tác động là được mong đợi trong một số trường hợp nhất định, ví dụ, trong trường hợp các kháng thể mà cơ chế tác động của chúng liên quan đến việc phong bế hoặc đối kháng, nhưng không giết các tế bào mang kháng nguyên đích. Chức năng tác động tăng lên thường được mong muốn khi được hướng đích các tế bào không mong muốn, như các tế bào khối u và ngoại lai, tại đó FcγRs được biểu hiện ở mức thấp, ví dụ, các tế bào B đặc hiệu khối u với các mức thấp của FcγRIIB (ví dụ, u lympho không phải Hodgkin, CLL, và u lympho Burkitt). Theo các phương án nêu trên, các phân tử theo sáng chế với hoạt tính chức năng tác động được biến đổi hoặc có được là hữu ích để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh, rối loạn hoặc lây nhiễm trong đó mong đợi sự hiệu nghiệm cao hơn của hoạt tính chức năng tác động.

Theo các phương án nhất định, các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều cải biến (ví dụ, các đoạn thay thế, làm khuyết, hoặc xen vào) đối với trình tự của các axit amin của vùng Fc kiểu dại (ví dụ, SEQ ID NO: 1), mà làm giảm ái lực và ái tính của vùng Fc đó và, kéo theo của phân tử theo sáng chế, đối với một hoặc nhiều thụ thể FcγR. Theo các phương pháp khác, các phân tử theo sáng chế bao gồm vùng Fc kiểu dại có một hoặc nhiều cải biến đối với axit amin của vùng Fc kiểu dại, mà làm tăng ái lực và ái tính của miền Fc đó và, kéo theo của phân tử theo sáng chế, đối với một hoặc nhiều thụ thể FcγR. Theo các phương pháp khác, các phân tử bao gồm biến thể vùng Fc, trong đó biến thể nêu trên mang lại hoặc điều tiết tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cell mediated cytotoxicity - ADCC) gia tăng và/hoặc liên kết với FcγRIIA tăng lên, so với phân tử không bao gồm vùng Fc hoặc bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo các phương án thay thế, các phân tử bao gồm vùng Fc biến thể trong đó biến thể này mang lại hoặc điều tiết hoạt tính ADCC (hoặc chức năng tác động khác) giảm đi và/hoặc liên kết với FcγRIIB tăng lên, so với phân tử không bao gồm vùng Fc hoặc bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm phân tử liên kết LAG-3 chứa vùng Fc biến thể, vùng Fc biến thể này không thể hiện liên

kết có thể phát hiện được với FcγR bất kỳ, so với phân tử tương đương bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo các phương pháp khác, sáng chế bao gồm các phân tử liên kết LAG-3 bao gồm vùng Fc biến thể, vùng Fc biến thể này chỉ liên kết với một FcγR, tốt hơn là một trong số FcγRIIA, FcγRIIB, hoặc FcγRIIIA. Ái lực và/hoặc ái tính tăng bất kỳ như vậy tốt hơn là được đánh giá bằng cách đo mức độ *in vitro* của liên kết có thể phát hiện được với FcγR hoặc hoạt tính có liên quan đến FcγR trong các tế bào mà biểu hiện các mức FcγR thấp khi hoạt tính liên kết của phân tử gốc (không có vùng Fc được cải biến) không thể được phát hiện ra trong các tế bào, hoặc trong các tế bào mà biểu hiện kháng nguyên đích của thụ thể không phải là FcγR ở mật độ nằm trong khoảng từ 30.000 đến 20.000 phân tử/tế bào, ở mật độ nằm trong khoảng từ 20.000 đến 10.000 phân tử/tế bào, ở mật độ nằm trong khoảng từ 10.000 đến 5.000 phân tử/tế bào, ở mật độ nằm trong khoảng từ 5.000 đến 1.000 phân tử/tế bào, ở mật độ nằm trong khoảng từ 1.000 đến 200 phân tử/tế bào hoặc ở mật độ 200 phân tử/tế bào hoặc ít hơn (nhưng ít nhất là 10, 50, 100 hoặc 150 phân tử/tế bào).

Phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể bao gồm miền Fc biến thể có các ái lực được biến đổi đối với thụ thể Fcγ hoạt hóa và/hoặc ức chế. Theo một phương án, phân tử liên kết LAG-3 bao gồm vùng Fc biến thể có ái lực tăng đối với FcγRIIB và ái lực giảm đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA, so với phân tử tương đương có vùng Fc kiểu dại. Theo một phương án khác, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, có ái lực giảm đối với FcγRIIB và ái lực tăng đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA, so với phân tử tương đương có vùng Fc kiểu dại. Theo một phương án khác, các phân tử LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể có ái lực giảm đối với FcγRIIB và ái lực giảm đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA, so với phân tử tương đương có vùng Fc kiểu dại. Theo một phương án khác nữa, các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, có ái lực không thay đổi đối với FcγRIIB và ái lực giảm (hoặc tăng) đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA, so với phân tử tương đương có vùng Fc kiểu dại.

Theo các phương án nhất định, các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể có ái lực thay đổi đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA sao cho globulin miễn dịch có chức năng tác động được tăng cường. Các ví dụ không giới hạn về chức năng của tế bào thực hiện bao gồm tính gây độc tế bào qua trung gian

tế bào phụ thuộc kháng thể, sự thực bào phụ thuộc kháng thể, sự thực bào, sự opsonin hóa các vi trùng, sự thực bào – opsonin hóa, liên kết tế bào, tạo hình hoa thị, liên kết C1q và tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc bổ thể.

Theo một phương án được ưu tiên, sự thay đổi ái lực hoặc chức năng tác động là ít nhất gấp hai lần, tốt hơn là ít nhất gấp 4 lần, ít nhất gấp 5 lần, ít nhất gấp 6 lần, ít nhất gấp 7 lần, ít nhất gấp 8 lần, ít nhất gấp 9 lần, ít nhất gấp 10 lần, ít nhất gấp 50 lần, hoặc ít nhất gấp 100 lần, so với phân tử tương đương bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo các phương án khác của sáng chế, vùng Fc biến thể liên kết đặc hiệu miễn dịch một hoặc nhiều FcR với ái lực lớn hơn ít nhất 65%, tốt nhất là ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 100%, ít nhất 125%, ít nhất 150%, ít nhất 175%, ít nhất 200%, ít nhất 225% hoặc ít nhất 250% so với phân tử bao gồm vùng Fc kiểu dại. Các phép đo như vậy có thể là các thử nghiệm *in vivo* hoặc *in vitro*, và theo một phương án được ưu tiên là các thử nghiệm *in vitro* như ELISA hoặc thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo các phương án khác nhau, các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể trong đó biến thể nêu trên chủ vận ít nhất một hoạt tính của thụ thể FcγR, hoặc đối kháng ít nhất một hoạt tính của thụ thể FcγR. Theo một phương pháp được ưu tiên, các phân tử bao gồm biến thể mà đối kháng một hoặc nhiều hoạt tính của FcγRIIB, ví dụ, sự truyền tín hiệu qua trung gian thụ thể tế bào B, sự hoạt hóa tế bào B, sự tăng sinh tế bào B, sự sản sinh kháng thể, dòng vào canxi nội bào của các tế bào B, sự tiến triển của chu trình tế bào, sự ức chế qua trung gian FcγRIIB đối với việc truyền tín hiệu FcεRI, sự phosphoryl hóa FcγRIIB, sự tuyển chọn SHIP, sự phosphoryl hóa SHIP và liên kết với Shc, hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều phân tử xuôi dòng (ví dụ, MAP kinaza, JNK, p38, hoặc Akt) trong con đường tải nạp tín hiệu FcγRIIB. Theo một phương án khác, các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm biến thể chủ vận một hoặc nhiều hoạt tính của FcεRI, ví dụ, sự hoạt hóa tế bào mast, sự chuyển động của canxi, sự mất hạt nhỏ, sự sản sinh xytokin, hoặc sự giải phóng serotonin.

Theo các phương án nhất định, các phân tử chứa vùng Fc bao gồm các vùng từ hai hoặc nhiều hơn hai isotyp IgG (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4). Như được sử

dụng ở đây, vùng Fc được cho là có isotyp IgG cụ thể nếu trình tự axit amin của nó hầu như đồng nhất với isotyp đó so với các isotyp IgG khác. Các isotyp IgG khác nhau thể hiện các tính chất vật lý và chức năng khác nhau bao gồm thời gian bán thải trong huyết thanh, sự cố định bổ thể, ái lực liên kết FcγR và các hoạt tính chức năng tác động (ví dụ, ADCC, CDC, v.v.) do các sai khác trong trình tự axit amin của các vùng Fc và/hoặc bản lề của chúng, ví dụ như được mô tả trong tài liệu Flesch and Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14: 141-156; Chappel et al. (1993) J. Biol. Chem. 33: 25124-25131; Chappel et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 9036-9040; hoặc Brüggemann et al. (1987) J. Exp. Med 166: 1351-1361. Loại vùng Fc biến thể này có thể được sử dụng một mình, hoặc kết hợp với cải biến axit amin, để tác động đến chức năng tác động qua trung gian Fc và/hoặc hoạt tính liên kết. Khi kết hợp, cải biến axit amin này và vùng bản lề IgG/vùng Fc có thể biểu lộ chức năng tương tự (ví dụ, ái lực tăng đối với FcγRIIA) và có thể hoạt động theo hướng cộng hợp, hoặc tốt hơn nữa là, theo hướng hiệp đồng để cải biến chức năng tác động trong phân tử theo sáng chế, so với phân tử theo sáng chế bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo các phương án khác, cải biến axit amin này và vùng Fc của IgG có thể biểu lộ các chức năng đối lập (ví dụ, ái lực tăng và giảm đối với FcγRIIA, một cách tương ứng) và có thể tác động để làm suy yếu hoặc làm giảm một cách chọn lọc chức năng cụ thể trong phân tử theo sáng chế, so với phân tử theo sáng chế không bao gồm vùng Fc hoặc bao gồm vùng Fc kiểu dại của cùng một isotyp.

Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể nêu trên bao gồm ít nhất một cải biến axit amin so với vùng Fc kiểu dại, sao cho phân tử nêu trên có ái lực thay đổi đối với FcR, với điều kiện là vùng Fc biến thể nêu trên không có cải biến thay thế tại các vị trí tiếp xúc trực tiếp với FcγR dựa trên phân tích cấu trúc và tinh thể học của các tương tác Fc-FcR như các tương tác được bộc lộ trong tài liệu Sondermann *et al.* (2000) Nature 406: 267-73. Các ví dụ về các vị trí trong vùng Fc tiếp xúc trực tiếp với FcγR là các gốc axit amin 234-239 (vùng bản lề), các gốc axit amin 265-269 (vòng lặp B/C), các gốc axit amin 297-299 (vòng lặp C'/E), và các gốc axit amin 327-332 (vòng lặp F/G). Theo một số phương án, các phân tử theo sáng chế bao gồm các vùng Fc biến thể bao gồm sự cải biến của ít nhất một gốc mà

không tiếp xúc trực tiếp với FcγR dựa trên phân tích cấu trúc và tinh thể học, ví dụ, không nằm trong vị trí liên kết Fc-FcγR.

Các vùng Fc biến thể đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và vùng Fc biến thể đã biết bất kỳ có thể được sử dụng trong sáng chế để mang lại hoặc cải biến chức năng tác động được biểu hiện bởi phân tử theo sáng chế bao gồm vùng Fc (hoặc một phần của nó) như được thử nghiệm về chức năng, ví dụ, trong thử nghiệm phụ thuộc đại thực bào hoặc phụ thuộc NK. Ví dụ, các biến thể vùng Fc đã được nhận biết là làm thay đổi chức năng tác động được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; và WO 2008/140603 và biến thể thích hợp bất kỳ được bộc lộ trong đó có thể được sử dụng trong các phân tử này.

Theo các phương án nhất định, các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, có một hoặc nhiều cải biến axit amin trong một hoặc nhiều vùng, mà (các) cải biến này làm thay đổi (so với vùng Fc kiểu dại) tỷ lệ của các ái lực của vùng Fc biến thể với FcγR hoạt hóa (như FcγRIIA hoặc FcγRIIIA) đối với FcγR ức chế (như FcγRIIB):

$$\text{Tỷ lệ của các ái lực} = \frac{\text{Thay đổi kiểu dại thành biến thể về ái lực với } Fc\gamma R_{\text{Hoạt hóa}}}{\text{Thay đổi kiểu dại thành biến thể về ái lực với } Fc\gamma R_{\text{Ức chế}}}$$

Được ưu tiên đặc biệt theo sáng chế là các phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có vùng Fc biến thể (so với vùng Fc kiểu dại) trong đó vùng Fc biến thể có tỷ lệ của các ái lực lớn hơn 1. Các phân tử như vậy đặc biệt hữu ích trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh, rối loạn, hoặc lây nhiễm, hoặc cải thiện triệu chứng của chúng, trong đó mong muốn có hiệu quả tăng cường của chức năng tế bào tác động (ví dụ, ADCC) được điều tiết bởi FcγR, ví dụ, bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm. Ngược lại, vùng Fc biến thể có tỷ lệ của các ái lực nhỏ hơn 1 điều tiết hiệu quả giảm của chức năng tế bào tác động. Bảng 1 liệt kê các đột biến đơn, đột biến đôi, đột biến ba, đột biến bốn và đột biến năm lấy làm ví dụ bằng cách xem tỷ lệ của các ái lực là lớn hơn hay nhỏ hơn 1.

| Bảng 1<br>Các đột biến đơn và đa đột biến được liệt kê bằng tỷ lệ của các ái lực | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Đột biến đơn | Đột biến đôi | Đột biến ba | Đột biến bốn | Đột biến năm |
| Tỷ lệ của các ái lực > 1 | | | | |
| F243L | F243L & R292P | F243L, P247L & N421K | L234F, F243L, R292P & Y300L | L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L |
| D270E | F243L & Y300L | F243L, R292P & Y300L | L235I, F243L, R292P & Y300L | L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L |
| R292G | F243L & P396L | F243L, R292P & V305I | L235Q, F243L, R292P & Y300L | F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L |
| R292P | D270E & P396L | F243L, R292P & P396L | F243L, P247L, D270E & N421K | |
| | R292P & Y300L | F243L, Y300L & P396L | F243L, R255L, D270E & P396L | |
| | R292P & V305I | P247L, D270E & N421K | F243L, D270E, G316D & R416G | |
| | R292P & P396L | R255L, D270E & P396L | F243L, D270E, K392T & P396L | |
| | Y300L & P396L | D270E, G316D & R416G | F243L, D270E, P396L & Q419H | |
| | P396L & Q419H | D270E, K392T & P396L | F243L, R292P, Y300L, & P396L | |
| | | D270E, P396L & Q419H | F243L, R292P, V305I & P396L | |
| | | V284M, R292L & K370N | P247L, D270E, Y300L & N421K | |
| | | R292P, Y300L & P396L | R255L, D270E, R292G & P396L | |

| Bảng 1<br>Các đột biến đơn và đa đột biến được liệt kê bằng tỷ lệ của các ái lực | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Đột biến đơn | Đột biến đôi | Đột biến ba | Đột biến bốn | Đột biến năm |
| | | | R255L, D270E, Y300L & P396L | |
| | | | D270E, G316D, P396L & R416G | |
| Tỷ lệ của các ái lực < 1 | | | | |
| Y300L | F243L & P396L | F243L, R292P & V305I | | |
| P396L | P247L & N421K | | | |
| | R255L & P396L | | | |
| | R292P & V305I | | | |
| | K392T & P396L | | | |
| | P396L & Q419H | | | |

Theo một phương án cụ thể, trong các vùng Fc biến thể, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, đoạn thay thế) tại vị trí bất kỳ trong số các vị trí 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328, hoặc 330 và tốt hơn là một hoặc nhiều gốc sau đây: A240, I240, L241, L243, H244, N298, I328 hoặc V330. Theo một phương án cụ thể khác, trong các vùng Fc biến thể, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, các đoạn thay thế) tại các vị trí bất kỳ trong số các vị trí 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439 và tốt hơn là một hoặc nhiều gốc trong số các gốc sau: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 hoặc L300.

Theo một phương án được ưu tiên, trong các vùng Fc biến thể liên kết với FcγR với ái lực biến đổi, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, đoạn thay thế) tại vị trí bất kỳ trong số các vị trí 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373,

376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439. Tốt hơn là, vùng Fc biến thể có gốc bất kỳ trong số các gốc sau: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 hoặc A430.

Theo một phương án khác, trong vùng Fc biến thể liên kết với FcγR (thông qua vùng Fc của nó) với ái lực giảm, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, đoạn thay thế) ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 hoặc 439.

Theo một phương án khác, trong vùng Fc biến thể liên kết với FcγR (thông qua vùng Fc của nó) với ái lực tăng cường, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, đoạn thay thế) ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 hoặc 430. Theo một phương án khác, trong vùng Fc biến thể liên kết với FcγRIIA với ái lực tăng cường, gốc bất kỳ trong số các gốc sau: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 hoặc A430.

Các biến thể được ưu tiên bao gồm một hoặc nhiều cải biến ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 hoặc 332.

Các biến thể được ưu tiên đặc biệt bao gồm một hoặc nhiều cải biến được chọn từ các nhóm từ A đến AI:

| | |
|---|---|
| A | 228E, 228K, 228Y hoặc 228G; |
| B | 230A, 230E, 230Y hoặc 230G; |
| C | 231E, 231K, 231Y, 231P hoặc 231G; |
| D | 232E, 232K, 232Y, 232G; |
| E | 233D; |
| F | 234I hoặc 234F; |

| | |
|---|---|
| G | 235D, 235Q, 235P, 235I hoặc 235V; |
| H | 239D, 239E, 239N hoặc 239Q; |
| I | 240A, 240I, 240M hoặc 240T; |
| J | 243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H hoặc 243I; |
| K | 244H; |
| L | 245A; |
| M | 247G, 247V hoặc 247L; |
| N | 262A, 262E, 262I, 262T, 262E hoặc 262F; |
| O | 263A, 263I, 263M hoặc 263T; |
| P | 264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T hoặc 264W; |
| Q | 265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N hoặc 265Q; |
| R | 266A, 266I, 266M hoặc 266T; |
| S | 271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W hoặc 271G; |
| T | 273I; |
| U | 275L hoặc 275W; |
| V | 281D, 281K, 281Y hoặc 281P; |
| W | 284E, 284N, 284T, 284L, 284Y hoặc 284M; |
| X | 291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I hoặc 291G; |
| Y | 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W hoặc 299Y; |
| Z | 302I; |
| AA | 304D, 304N, 304T, 304H hoặc 304L |
| AB | 305I; |
| AC | 313F; |
| AD | 323I; |
| AE | 325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W hoặc 325P; |
| AF | 328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M hoặc 328N; |
| AG | 330L, 330Y, 330I hoặc 330V; |
| AH | 332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G hoặc 332Y; và |
| AI | 336E, 336K hoặc 336Y |

Các biến thể được ưu tiên đặc biệt hơn nữa bao gồm một hoặc nhiều cải biến được chọn từ nhóm 1-105:

| Nhóm | Biến thể | Nhóm | Biến thể |
|---|---|---|---|
| 1 | A330L/I332E | 54 | S239D/D265L/N297D/I332E |
| 2 | D265F/N297E/I332E | 55 | S239D/D265T/N297D/I332E |
| 3 | D265Y/N297D/I332E | 56 | S239D/D265V/N297D/I332E |
| 4 | D265Y/N297D/T299L/I332E | 57 | S239D/D265Y/N297D/I332E |
| 5 | F241E/F243Q/V262T/V264F | 58 | S239D/I332D |
| 6 | F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E | 59 | S239D/I332E |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 7 | F241E/F243R/V262E/V264R | 60 | S239D/I332E/A330I |
| 8 | F241E/F243R/V262E/V264R/I332E | 61 | S239D/I332N |
| 9 | F241E/F243Y/V262T/V264R | 62 | S239D/I332Q |
| 10 | F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E | 63 | S239D/N297D/I332E |
| 11 | F241L/F243L/V262I/V264I | 64 | S239D/N297D/I332E/A330Y |
| 12 | F241L/V262I | 65 | S239D/N297D/I332E/A330Y/F241S/F243H/V262T/V264T |
| 13 | F241R/F243Q/V262T/V264R | 66 | S239D/N297D/I332E/K326E |
| 14 | F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E | 67 | S239D/N297D/I332E/L235D |
| 15 | F241W/F243W/V262A/V264A | 68 | S239D/S298A/I332E |
| 16 | F241Y/F243Y/V262T/V264T | 69 | S239D/V264I/A330L/I332E |
| 17 | F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E | 70 | S239D/V264I/I332E |
| 18 | F243L/V262I/V264W | 71 | S239D/V264I/S298A/I332E |
| 19 | P243L/V264I | 72 | S239E/D265N |
| 20 | L328D/I332E | 73 | S239E/D265Q |
| 21 | L328E/I332E | 74 | S239E/I332D |
| 22 | L328H/I332E | 75 | S239E/I332E |
| 23 | L328I/I332E | 76 | S239E/I332N |
| 24 | L328M/I332E | 77 | S239E/I332Q |
| 25 | L328N/I332E | 78 | S239E/N297D/I332E |
| 26 | L328Q/I332E | 79 | S239E/V264I/A330Y/I332 E |
| 27 | L328T/I332E | 80 | S239E/V264I/I332 E |
| 28 | L328V/I332E | 81 | S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E |
| 29 | N297D/A330Y/I332E | 82 | S239N/A330L/I332E |
| 30 | N297D/I332E | 83 | S239N/A330Y/I332E |
| 31 | N297D/I332E/S239D/A330L | 84 | S239N/I332D |
| 32 | N297D/S298A/A330Y/I332E | 85 | S239N/I332E |
| 33 | N297D/T299L/I332E | 86 | S239N/I332N |
| 34 | N297D/T299F/I332E/N297D/T299H/I332E | 87 | S239N/I332Q |
| 35 | N297D/T299I/I332E | 88 | S239N1S298A/I332E |
| 36 | N297D/T299L/I332E | 89 | S239Q/I332D |
| 37 | N297D/T299V/I332E | 90 | S239Q/I332E |
| 38 | N297E/I332E | 91 | S239Q/I332N |
| 39 | N297S/I332E | 92 | S239Q/I332Q |
| 40 | P230A/E233D/I332E | 93 | S239Q/V264I/I332E |
| 41 | P244H/P245A/P247V | 94 | S298A/I332E |
| 42 | S239D/A330L/I332E | 95 | V264E/N297D/I332E |
| 43 | S239D/A330Y/I332E | 96 | V264I/A330L/I332E |
| 44 | S239D/A330Y/I332E/K326E | 97 | V264I/A330Y/I332E |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 45 | S239D/A330Y/I332E/K326T | 98 | V264I/I332E |
| 46 | S239D/A330Y/I332E/L234I | 99 | V264I/S298A/I332E |
| 47 | S239D/A330Y/I332E/L235D | 100 | Y296D/N297D/I332E |
| 48 | S239D/A330Y/I332E/V240I | 101 | Y296E/N297D/I332 E |
| 49 | S239D/A330Y/I332E/V264T | 102 | Y296H/N297D/I332E |
| 50 | S239D/A330Y/I332E/V266I | 103 | Y296N/N297D/I332E |
| 51 | S239D/D265F/N297D/I332E | 104 | Y296Q/N297I/I332E |
| 52 | S239D/D265H/N297D/I332E | 105 | Y296T/N297D/I332E |
| 53 | S239D/D265I/N297D/I332E | | |

Theo một phương án, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế sẽ chứa vùng Fc biến thể có ít nhất một cải biến trong vùng Fc. Theo các phương án nhất định, vùng Fc biến thể chứa ít nhất một đoạn thay thế được chọn từ nhóm bao gồm L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I, và P396L, trong đó việc đánh số nêu trên là đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc biến thể chứa:

(A) ít nhất một đoạn thay thế được chọn từ nhóm bao gồm F243L, R292P, Y300L, V305I, và P396L;

(B) ít nhất hai đoạn thay thế được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) F243L và P396L;

(2) F243L và R292P; và

(3) R292P và V305I;

(C) ít nhất ba đoạn thay thế được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) F243L, R292P và Y300L;

(2) F243L, R292P và V305I;

(3) F243L, R292P và P396L; và

(4) R292P, V305I và P396L;

(D) ít nhất bốn đoạn thay thế được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) F243L, R292P, Y300L và P396L; và

(2) F243L, R292P, V305I và P396L; hoặc

(E) ít nhất năm đoạn thay thế được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) F243L, R292P, Y300L, V305I và P396L; và

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L.

Theo một phương án cụ thể khác, vùng Fc biến thể chứa các đoạn thay thế của:

(A) F243L, R292P, và Y300L;

(B) L235V, F243L, R292P, Y300L, và P396L; hoặc

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I, và P396L.

Theo một phương án, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế chứa vùng Fc biến thể biểu hiện khả năng liên kết giảm (hoặc gần như không liên kết) với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng liên kết được biểu hiện bởi vùng Fc của IgG1 kiểu dại (SEQ ID NO:1)). Theo một phương án, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế chứa vùng Fc biến thể biểu hiện khả năng liên kết giảm (hoặc gần như không liên kết) với FcγR (ví dụ, FcγRIIIA) và chức năng tác động ADCC giảm (hoặc gần như không có chức năng này). Theo các phương án nhất định, vùng Fc biến thể chứa ít nhất một đoạn thay thế được chọn từ nhóm bao gồm L234A, L235A, D265A, N297Q, và N297G. Theo một phương án cụ thể, vùng Fc biến thể chứa đoạn thay thế của L234A; L235A; L234A và L235A; D265A; N297Q, hoặc N297G.

Theo một phương án khác, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế chứa vùng Fc vốn biểu hiện khả năng liên kết giảm (hoặc gần như không liên kết) với FcγRIIIA (CD16a) và/hoặc chức năng tác động giảm (so với khả năng liên kết được biểu hiện bởi vùng Fc của IgG1 kiểu dại (SEQ ID NO:1)). Theo một phương án cụ thể, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế chứa vùng Fc của IgG2 (SEQ ID NO:2) hoặc vùng Fc của IgG4 (SEQ ID:NO:4). Khi vùng Fc của IgG4 được sử dụng, sáng chế cũng bao gồm việc đưa vào đột biến ổn định, đoạn thay thế S228P của vùng bản lề IgG4 như vậy (xem, ví dụ, SEQ ID NO:117: ESKYGPPCPPCP, (Lu *et al.*, (2008) "*The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation*", J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969) để làm giảm phạm vi ảnh hưởng của sự trao đổi chuỗi. Các đột biến ổn định khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được đưa vào vùng Fc của IgG4 (Peters, P *et al.*, (2012) "*Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability*", J. Biol. Chem., 287:24525-24533; Công bố đơn sáng chế quốc tế số: WO 2008/145142).

Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm việc sử dụng biến thể Fc bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các biến thể được bộc lộ trong tài liệu Jefferis, B.J. *et al.* (2002) "*Interaction Sites On Human IgG-*Fc *For FcgammaR: Current Models*", Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. *et al.* (2002) "*Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function*", Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. *et al.* (2001) "*Engineered Antibdies With Increased Activity To Recruit Complement*", J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. *et al.* (2001) "*High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R*", J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. *et al.* (2000) "*Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc*", J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. *et al.* (2000) "*Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4*", J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. *et al.* (2000) "*In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies*", Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. *et al.* (1999) "*Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities*", Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. *et al.* (1996) "*Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions*", Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. *et al.* (1996) "*Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains*", J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins *et al.* (1995) "*Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. *et al.* (1995) "*Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation*", Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. *et al.* (1995) "*Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors*", FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. *et al.* (1994) "*A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo*", Transplantation 57:1537-1543; Lund *et al.* (1992) "*Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse*

*Fc Gamma R11*", Mol. Immunol. 29:53-59; Lund *et al.* (1991) "*Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG*", J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. *et al.* (1988) "*Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG*", Nature 332:563-564; Patent Mỹ số 5624821; 5885573; 6194551; 7276586; và 7317091; và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 00/42072 và PCT WO 99/58572.

Theo một số phương án, các phân tử theo sáng chế còn chứa một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa, sao cho một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được gắn cộng hóa trị vào phân tử này. Tốt hơn là, các phân tử theo sáng chế có một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa và/hoặc một hoặc nhiều cải biến trong vùng Fc mang lại hoặc có chức năng tác động qua trung gian kháng thể được tăng cường, ví dụ, hoạt tính ADCC được tăng cường, so với kháng thể không được cải biến. Theo một số phương án, sáng chế còn bao gồm các phân tử chứa một hoặc nhiều cải biến của axit amin mà được biết đến là tương tác trực tiếp hoặc gián tiếp với gốc hydrat cacbon của vùng Fc, gồm nhưng không giới hạn ở các axit amin ở các vị trí 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, hoặc 301. Các axit amin mà tương tác trực tiếp hoặc gián tiếp với gốc hydrat cacbon của vùng Fc đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, xem, ví dụ, Jefferis *et al.*, 1995 *Immunology Letters*, 44: 111-7, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến các phân tử được cải biến bằng cách đưa một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa vào một hoặc nhiều vị trí của phân tử, tốt hơn là không làm thay đổi chức năng của phân tử này, ví dụ, hoạt tính liên kết với kháng nguyên đích hoặc FcγR. Vị trí glycosyl hóa có thể được đưa vào vùng biến đổi và/hoặc vùng hằng định của các phân tử theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, "vị trí glycosyl hóa" bao gồm trình tự axit amin cụ thể bất kỳ trong kháng thể mà oligosacarit (nghĩa là, hydrat cacbon chứa hai hoặc nhiều hơn hai đường đơn giản được liên kết với nhau) sẽ gắn theo cách đặc hiệu và cộng hóa trị. Chuỗi bên oligosacarit thường được liên kết với mạch khung của kháng thể thông qua liên kết N hoặc O. Việc glycosyl hóa liên kết với N dùng để chỉ việc gắn gốc oligosacarit vào chuỗi bên của gốc asparagin. Việc glycosyl hóa được liên kết với O dùng để chỉ việc gắn gốc oligosacarit vào axit hydroxyamin, ví dụ, serin, threonin. Các phân tử

theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa, bao gồm vị trí glycosyl hóa liên kết với N và liên kết với O. Vị trí glycosyl hóa bất kỳ đối với sự glycosyl hóa được liên kết với N hoặc liên kết với O đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng theo sáng chế. Vị trí glycosyl hóa liên kết với N được nêu làm ví dụ mà hữu ích theo các phương pháp theo sáng chế là trình tự axit amin: Asn-X-Thr/Ser, trong đó X có thể là axit amin bất kỳ và Thr/Ser chỉ threonin hoặc serin. Vị trí này hoặc các vị trí có thể được đưa vào phân tử theo sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế này liên quan đến (xem ví dụ, *IN VITRO* MUTAGENESIS, RECOMBINANT DNA: A SHORT COURSE, J. D. Watson, *et al.* W.H. Freeman and Company, New York, 1983, chương 8, trang 106-116, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Một phương pháp được nêu làm ví dụ để đưa vị trí glycosyl hóa vào phân tử theo sáng chế có thể bao gồm bước: cải biến hoặc tạo đột biến trình tự axit amin của phân tử sao cho thu được trình tự Asn-X-Thr/Ser mong muốn.

Theo một số phương án, sáng chế bao gồm phương pháp cải biến hàm lượng hydrat cacbon trong phân tử theo sáng chế bằng cách thêm hoặc làm khuyết vị trí glycosyl hóa. Phương pháp cải biến hàm lượng hydrat cacbon của kháng thể (và các phân tử chứa miền kháng thể, ví dụ, vùng Fc) là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và nằm trong phạm vi của sáng chế, xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6218149; EP 0 359 096 B1; Công bố đơn Mỹ số US 2002/0028486; WO 03/035835; Công bố đơn Mỹ số 2003/0115614; Patent Mỹ số 6218149; Patent Mỹ số 6472511; tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp cải biến hàm lượng hydrat cacbon của phân tử theo sáng chế bằng cách làm khuyết một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon nội sinh của phân tử. Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao gồm việc dịch chuyển vị trí glycosyl hóa của vùng Fc của kháng thể, bằng cách thay đổi các vị trí liền kề với vị trí 297. Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao gồm việc cải biến vị trí 296 sao cho vị trí 296 và không phải vị trí 297 được glycosyl hóa.

Chức năng tác động cũng có thể được cải biến bằng các kỹ thuật như bằng cách đưa một hoặc nhiều gốc xystein vào vùng Fc, nhờ đó cho phép diễn ra sự tạo thành liên kết disulfua liên chuỗi trong vùng này, dẫn đến việc tạo ra kháng thể homodime

mà có thể có khả năng tiếp nhận cải thiện và/hoặc giết tế bào qua trung gian bổ thể và ADCC tăng (Caron, P.C. *et al.* (1992) "*Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies*", J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) "*A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity*", J. Immunol. 148(9):2918-2922. Các kháng thể homodime có hoạt tính chống khối u tăng cường cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng tác nhân liên kết chéo hai chức khác loại như được mô tả trong tài liệu Wolff, E.A. *et al.* (1993) "*Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice*", Cancer Research 53:2560-2565. Theo cách khác, kháng thể có thể được xử lý kỹ thuật là có vùng Fc kép và nhờ đó có thể có sự phân giải bổ thể và khả năng ADCC tăng cường (Stevenson, G.T. *et al.* (1989) "*A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge*", Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

Thời gian bán thải trong huyết thanh của các phân tử theo sáng chế bao gồm các vùng Fc có thể tăng lên bằng cách làm tăng ái lực liên kết của vùng Fc đối với FcRn. Thuật ngữ "thời gian bán thải" như được sử dụng ở đây có nghĩa là đặc tính dược động học của phân tử là số đo về thời gian sống sót trung bình của các phân tử sau khi dùng chúng. Thời gian bán thải có thể được biểu thị dưới dạng thời gian cần để loại bỏ năm mươi phần trăm (50%) lượng đã biết của phân tử khỏi cơ thể của đối tượng (ví dụ, người bệnh hoặc động vật có vú khác) hoặc bộ phận cụ thể của họ, ví dụ, như được đo trong huyết thanh, nghĩa là, thời gian bán thải tuần hoàn, hoặc trong các mô khác. Nhìn chung, việc làm tăng thời gian bán thải dẫn đến làm tăng thời gian ổn định trung bình (mean residence time - MRT) khi tuần hoàn đối với phân tử được dùng.

Theo một số phương án, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể chứa ít nhất một cải biến axit amin so với vùng Fc kiểu dại và biểu hiện thời gian bán thải tăng (so với vùng Fc kiểu dại).

Theo một số phương án, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể chứa đoạn thay thế axit amin kéo dài thời gian bán thải ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286,

288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435, và 436, như được đánh số bằng chỉ số EU theo Kabat. Nhiều đột biến cụ thể có khả năng làm tăng thời gian bán thải của phân tử chứa vùng Fc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ M252Y, S254T, T256E, và các tổ hợp của chúng. Ví dụ, xem các đột biến được mô tả trong Patent Mỹ số 6277375, 7083784; 7217797, 8088376; Công bố đơn Mỹ số 2002/0147311; 2007/0148164; và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 98/23289, WO 2009/058492, và WO 2010/033279, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Phân tử chứa vùng Fc có thời gian bán thải tăng cường còn bao gồm các phân tử có các đoạn thay thế ở hai hoặc nhiều hơn hai gốc của vùng Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 và 436. Cụ thể, hai hoặc nhiều hơn hai đoạn thay thế được chọn từ: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K, và Y436I.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc biến thể chứa các đoạn thay thế của:

(A) 252Y, 254T và 256E;

(B) M252Y và S254T;

(C) M252Y và T256E;

(D) 250Q và 428L;

(E) T307Q và N434A;

(F) A378V và N434A;

(G) N434A và Y436I;

(H) V308P và N434A; hoặc

(I) K288D và H435K.

Sáng chế còn bao gồm vùng Fc biến thể chứa:

(A) một hoặc nhiều đột biến làm thay đổi chức năng tác động và/hoặc FcγR; và

(B) một hoặc nhiều đột biến kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh.

VI. Phân tử liên kết LAG-3 đặc hiệu kép theo sáng chế

Một phương án của sáng chế đề cập đến phân tử liên kết đặc hiệu kép có khả năng liên kết với "epitop thứ nhất" và "epitop thứ hai", trong đó epitop thứ nhất này là epitop của LAG-3 ở người và epitop thứ hai là cùng epitop đó hoặc một epitop khác của LAG-3, hoặc là epitop của một phân tử khác có trên bề mặt của tế bào miễn dịch (như tế bào lympho T) và liên quan đến việc điều hòa điểm kiểm tra miễn dịch. Theo các phương án nhất định, epitop thứ hai tốt hơn nếu không phải là epitop của LAG-3. Theo một phương án, epitop thứ hai là epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC lớp I hoặc II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 hoặc VISTA. Theo một phương án cụ thể, epitop thứ hai là CD137, PD-1, OX40, TIGIT, hoặc TIM-3. Theo các phương án nhất định, các phân tử đặc hiệu kép này chứa nhiều hơn hai vị trí liên kết epitop. Các phân tử đặc hiệu kép này có thể, ví dụ, liên kết hai hoặc nhiều hơn hai epitop khác nhau của LAG-3 và ít nhất một epitop của phân tử không phải là LAG-3.

Sáng chế bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép có khả năng liên kết đồng thời với LAG-3 và epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.*). Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép có khả năng liên kết đồng thời với PD-1 và epitop thứ hai này được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873, và WO 2014/022540, mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

1. Kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép thiếu vùng Fc

Một phương án của sáng chế đề cập đến kháng tổ hợp kép đơn giá đặc hiệu kép bao gồm, và tốt nhất là bao gồm, chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, trình tự của chúng cho phép các chuỗi polypeptit này liên kết cộng hóa trị với nhau để tạo ra kháng tổ hợp kép được kết hợp cộng hóa trị mà có khả năng liên kết đồng thời với epitop thứ nhất ("Epitop 1") và epitop thứ hai (Epitop 2"), các epitop này không giống hệt với epitop khác. Do đó, các kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép này chứa miền "VL1"/"VH1" có khả năng liên kết với epitop thứ nhất ($VL_{Epitop\ 1}/VH_{Epitop\ 1}$) và miền "VL2"/"VH2" có khả năng liên kết với epitop thứ hai ($VL_{Epitop\ 2}/VH_{Epitop\ 2}$). Ký hiệu "VL1" và "VH1" lần lượt dùng để chỉ miền chuỗi nhẹ biến đổi và miền chuỗi nặng biến đổi mà liên kết với epitop "thứ nhất" của kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép này. Tương tự, ký hiệu "VL2" và "VH2" lần lượt dùng để chỉ, miền chuỗi nhẹ biến đổi và miền chuỗi nặng biến đổi mà liên kết với epitop "thứ hai" của kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép này. Theo một phương án, Epitop 1 của phân tử kháng tổ hợp kép này là epitop của LAG-3 và Epitop 2 của các phân tử kháng tổ hợp kép này không phải là epitop của LAG-3 (ví dụ, đó là epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.*).

Miền VL của chuỗi polypeptit thứ nhất của các kháng tổ hợp kép liên kết LAG-2 tương tác với miền VH của chuỗi polypeptit thứ hai để tạo ra vị trí liên kết epitop chức năng thứ nhất đặc hiệu đối với kháng nguyên thứ nhất (nghĩa là, LAG-3 hoặc kháng nguyên chứa epitop thứ hai). Tương tự, miền VL của chuỗi polypeptit thứ hai tương tác với miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất để tạo ra vị trí liên kết epitop chức năng thứ hai đặc hiệu đối với kháng nguyên thứ hai (nghĩa là, kháng nguyên chứa epitop thứ hai hoặc LAG-3). Vì vậy, việc lựa chọn miền VL và miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai được kết hợp, sao cho hai chuỗi polypeptit này của kháng tổ hợp kép cùng chứa miền VL và miền VH có khả năng liên kết với cả epitop của LAG-3 và epitop thứ hai (nghĩa là, chúng cùng chứa miền $VL_{LAG-3}/VH_{LAG-3}$ và $VL_{Epitop\ 2}/VH_{Epitop\ 2}$). Bất chấp cặp cụ thể của miền liên kết (nghĩa là, $VL_{Epitop\ 1}/VH_{Epitop\ 1}$ hoặc $VL_{Epitop\ 2}/VH_{Epitop\ 2}$) epitop của kháng nguyên có Epitop 1 hoặc epitop của kháng nguyên có Epitop 2) được chỉ định là epitop thứ nhất

so với epitop thứ hai của kháng tổ hợp kép; thì ký hiệu này cũng chỉ thích hợp đối với sự có mặt và định hướng của các miền của chuỗi polypeptit của các phân tử liên kết theo sáng chế.

Chuỗi polypeptit thứ nhất theo phương án về kháng tổ hợp kép đơn giá đặc hiệu kép này chứa, theo chiều từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với epitop thứ nhất hoặc miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với epitop thứ hai (nghĩa là, $VL_{LAG-3}$ hoặc $VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm xen giữa thứ nhất (tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với epitop thứ hai (nếu chuỗi polypeptit thứ nhất này chứa $VL_{LAG-3}$) hoặc miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với epitop thứ nhất (nếu chuỗi polypeptit thứ nhất này chứa $VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm xen giữa thứ hai (tác nhân liên kết 2), tùy ý chứa gốc xystein, miền kích thích heterodime và đầu tận C (Fig. 1).

Chuỗi polypeptit thứ hai theo phương án này của kháng tổ hợp kép đơn giá đặc hiệu kép chứa, theo chiều từ đầu tận N đến đầu tận C, đầu tận N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với LAG-3 hoặc miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với epitop thứ hai (nghĩa là, $VL_{LAG-3}$ hoặc $VL_{Epitop\ 2}$, và là miền VL không được lựa chọn để bao gồm trong chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng tổ hợp kép), peptit liên kết xen giữa (tác nhân liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với epitop thứ hai (nếu chuỗi polypeptit thứ hai này chứa $VL_{LAG-3}$) hoặc miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng liên kết với LAG-3 (nếu chuỗi polypeptit thứ hai này chứa $VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm xen giữa thứ hai (tác nhân liên kết 2) tùy ý chứa gốc xystein, miền kích thích heterodime, và đầu tận C (Fig. 1).

Tốt nhất là, chiều dài của peptit liên kết xen giữa (ví dụ, tác nhân liên kết 1) mà tách riêng miền VL và miền VH này) được chọn lọc để về cơ bản ngăn chặn hoặc ngăn chặn hoàn toàn việc miền VL và miền VH của chuỗi polypeptit liên kết với một chuỗi khác. Vì vậy, miền VL và miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất gần như hoặc hoàn toàn không có khả năng liên kết với một miền khác. Tương tự, miền VL và miền VH của chuỗi polypeptit thứ hai gần như hoặc hoàn toàn không có khả năng

liên kết với một miền khác. Peptit đệm xen giữa (tác nhân liên kết 1) được ưu tiên có trình tự (SEQ ID NO:88): GGGSGGGG.

Chiều dài và hợp phần của peptit liên kết xen giữa thứ hai (tác nhân liên kết 2) được chọn lọc dựa trên việc lựa chọn miền kích thích heterodime. Thông thường, peptit liên kết xen giữa thứ hai (tác nhân liên kết 2) sẽ chứa từ 3 đến 20 gốc axit amin. Cụ thể, khi miền kích thích heterodime không chứa gốc xystein, thì peptit liên kết xen giữa thứ hai chứa xystein (tác nhân liên kết 2) được sử dụng. Peptit đệm xen giữa thứ hai chứa xystein (tác nhân liên kết 2) sẽ chứa 1, 2, 3 hoặc nhiều hơn 3 gốc xystein. Peptit đệm chứa xystein (tác nhân liên kết 2) được ưu tiên có trình tự là SEQ ID NO:89: GGCGGG. Theo cách khác, tác nhân liên kết 2 không chứa xystein (ví dụ, GGG, GGGS (SEQ ID NO:90), LGGGSG (SEQ ID NO:91), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:92), ASTKG (SEQ ID NO:93), LEPKSS (SEQ ID NO:94), APSSS (SEQ ID NO:95), *v.v.)* và miền kích thích heterodime chứa xystein, như được mô tả dưới đây, được sử dụng. Tùy ý, cả tác nhân liên kết 2 chứa xystein và miền kích thích heterodime chứa xystein đều được sử dụng.

Miền kích thích heterodime có thể là GVEPKSC (SEQ ID NO:96) hoặc VEPKSC (SEQ ID NO:97) hoặc AEPKSC (SEQ ID NO:98) trên một chuỗi polypeptit và GFNRGEC (SEQ ID NO:99) hoặc FNRGEC (SEQ ID NO:100) trên chuỗi polypeptit còn lại (US2007/0004909).

Tuy nhiên, tốt hơn nữa là, miền kích thích heterodime của các kháng tổ hợp kép này được tạo ra từ một, hai, ba hoặc bốn miền xoắn lặp nối tiếp có điện tích trái dấu mà chứa trình tự có ít nhất sáu, ít nhất bảy hoặc ít nhất tám gốc axit amin sao cho miền kích thích heterodime này có điện tích toàn phần (Apostolovic, B. *et al.* (2008) "*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil*", Biomacromolecules 9:3173–3180; Arndt, K.M. *et al.* (2001) "*Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain*", J. Molec. Biol. 312:221-228; Arndt, K.M. *et al.* (2002) "*Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils*", Structure 10:1235-1248; Boucher, C. *et al.* (2010) "*Protein Detection By Western Blot Via Coiled–Coil Interactions*", Analytical

Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. *et al.* (2004) "*Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*", J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. *et al.* (2003) "*Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding*", Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodriquez, J. *et al.* (2012) "*Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag*", Protein Science 21:511-519; Ghosh, T.S. *et al.* (2009) "*End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures*", Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. *et al.* (2008) "*Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions*", Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. *et al.* (2002) "*Designing Heterodimeric Two-Stranded α-Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α-Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity*", J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. *et al.* (2012) "*The d'--d--d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'--a--a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif*", J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626–2633; Straussman, R. *et al.* (2007) "*Kinking the Coiled Coil – Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface*", J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. *et al.* (2002) "*Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance*", J. Molec. Biol. 323:345–362; Woolfson, D.N. (2005) "*The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies*", Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. *et al.* (2008) "*A Ligand-Pseudoreceptor System Based on de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism*", J. Gene Med. 10:355-367).

Các miền xoắn lặp như vậy có thể là các đoạn lặp chính xác hoặc có thể có các đoạn thay thế. Ví dụ, miền xoắn của miền kích thích heterodime của chuỗi polypeptit thứ nhất có thể chứa trình tự có tám gốc axit amin được chọn để mang lại điện tích âm cho miền kích thích heterodime này, và miền xoắn của miền kích thích

heterodime của chuỗi polypeptit thứ hai có thể chứa trình tự có tám gốc axit amin được chọn để mang lại điện tích dương cho miền kích thích heterodime này. Không quan trọng vòng xoắn nào được cung cấp cho chuỗi polypeptit thứ nhất hoặc thứ hai, miễn là, khi cả hai chuỗi polypeptit được tạo ra có các miền kích thích heterodime như vậy, thì vòng xoắn có điện tích dương được sử dụng cho chuỗi polypeptit còn lại. Axit amin tích điện dương có thể là lysin, arginin, histidin, *v.v.* và/hoặc axit amin tích điện âm có thể là axit glutamic, axit aspartic, *v.v.*. Axit amin tích điện dương tốt hơn là lysin và/hoặc axit amin tích điện âm tốt hơn là axit glutamic. Có thể là chỉ duy nhất một miền kích thích heterodime được sử dụng (do miền này sẽ ức chế sự homodime hóa và nhờ đó thúc đẩy sự heterodime hóa), tuy nhiên, tốt hơn là cả chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ nhất thứ hai của kháng tổ hợp kép theo sáng chế đều chứa miền kích thích heterodime.

Theo một phương án được ưu tiên, một trong các miền kích thích heterodime chứa bốn miền xoắn "vòng xoắn E" nối tiếp (SEQ ID NO:101: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), gốc glutamat của nó tạo ra điện tích âm ở độ pH = 7, trong khi miền còn lại trong số các miền kích thích heterodime sẽ chứa bốn miền xoắn "vòng xoắn K" nối tiếp (SEQ ID NO:102: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), gốc lysin của nó sẽ tạo ra điện tích dương ở độ pH = 7. Sự có mặt của các miền tích điện như vậy thúc đẩy sự kết hợp giữa polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai, và vì vậy tạo thuận lợi cho sự tạo thành heterodime. Được ưu tiên đặc biệt là miền kích thích heterodime trong đó một trong bốn miền xoắn "vòng xoắn E" nối tiếp nêu trong SEQ ID NO:101 được cải biến để chứa gốc xystein: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:103). Tương tự, đặc biệt được ưu tiên là miền kích thích heterodime trong đó một trong bốn miền xoắn "vòng xoắn K" nối tiếp nêu trong SEQ ID NO:102 được cải biến để chứa gốc xystein: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:104).

Như được bộc lộ trong WO 2012/018687, để cải thiện các tính chất dược động học *in vivo* của kháng tổ hợp kép, kháng tổ hợp kép này có thể được cải biến để chứa phần polypeptit của protein liên kết với huyết thanh ở một hoặc nhiều đầu tận của kháng tổ hợp kép. Tốt nhất là, phần polypeptit của protein liên kết với huyết thanh này được bố trí ở đầu tận C của kháng tổ hợp kép. Albumin là protein phổ biến nhất

trong huyết tương và có thời gian bán thải ở người là 19 ngày. Albumin có một vài vị trí liên kết phân tử nhỏ mà cho phép nó liên kết không cộng hóa trị với các protein khác và nhờ đó kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh của chúng. Miền liên kết albumin 3 (ABD3) của protein G của chủng *Streptococcus* G148 gồm 46 gốc axit amin tạo ra bó ba xoắn ổn định và có tính đặc hiệu liên kết albumin rộng (Johansson, M.U. *et al.* (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Module*s", J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120. Vì vậy, phần polypeptit được ưu tiên đặc biệt của protein liên kết với huyết thanh để cải thiện các tính chất dược động học *in vivo* của kháng tổ hợp kép là miền liên kết albumin (ABD) từ protein G của *streptococcal*, và tốt hơn nữa là, miền liên kết albumin 3 (ABD3) của protein G của chủng *Streptococcus* G148 (SEQ ID NO:105): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Như được bộc lộ trong WO 2012/162068 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), biến thể "được loại miễn dịch" nêu trong SEQ ID NO:105 có khả năng làm giảm bớt hoặc loại bỏ sự liên kết kết MHC lớp II. Dựa trên các kết quả đột biến kết hợp, các tổ hợp đoạn thay thế sau đây được coi là các đoạn thay thế ưu tiên để tạo ra ABD được loại miễn dịch như vậy: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. ABD biến thể có các cải biến L64A, I65A và D79A hoặc các cải biến N66S, T70S và D79A. ABD được loại miễn dịch biến thể có trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI$\underline{D}_{66}$NAK$\underline{S}_{70}$ $\underline{A}_{71}$EGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:106),

hoặc trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN$\underline{A}_{64}\underline{A}_{65}$NNAKT VEGVKALI$\underline{A}_{79}$E ILAALP (SEQ ID NO:107),

hoặc trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI$\underline{S}_{66}$NAK$\underline{S}_{70}$ VEGVKALI$\underline{A}_{79}$E ILAALP (SEQ ID NO:108),

được đặc biệt ưu tiên do ABD được loại miễn dịch này về cơ bản biểu hiện sự liên kết kiểu dại trong khi tạo ra sự liên kết MHC lớp II giảm. Vì vậy, chuỗi polypeptit

thứ nhất của kháng tổ hợp kép này có ABD chứa tác nhân liên kết thứ ba (tác nhân liên kết 3) tốt hơn là được đặt ở đầu tận C đối với miền vòng xoắn E (hoặc vòng xoắn K) của chuỗi polypeptit này sao cho để xen vào giữa miền vòng xoắn E (hoặc vòng xoắn K) và ABD (mà tốt hơn là ABD được loại miễn dịch). Trình tự được ưu tiên đối với tác nhân liên kết 3 này là SEQ ID NO:90: GGGS.

2. Kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép chứa vùng Fc

Một phương án của sáng chế đề cập đến các kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép chứa vùng Fc có khả năng liên kết đồng thời với LAG-3 và epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.*). Việc thêm miền CH2-CH3 của IgG vào một hoặc cả hai chuỗi polypeptit của kháng tổ hợp kép, sao cho việc tạo phức các chuỗi của kháng tổ hợp kép dẫn đến việc tạo thành vùng Fc, làm tăng thời gian bán thải sinh học và/hoặc làm thay đổi hóa trị của kháng tổ hợp kép. Việc kết hợp miền CH2-CH3 của IgG lên trên cả hai polypeptit của kháng tổ hợp kép này cho phép tạo ra kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc đặc hiệu kép hai chuỗi (Fig. 2).

Theo cách khác, việc kết hợp miền CH2-CH3 của IgG lên trên chỉ một trong các polypeptit của kháng tổ hợp kép cho phép tạo ra kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc đặc hiệu kép bốn chuỗi phức tạp hơn (các hình vẽ từ Fig. 3A đến Fig. 3C). Fig. 3C thể hiện kháng tổ hợp kép bốn chuỗi đại diện có miền nhẹ hằng định (CL) và miền CH1 nặng hằng định, tuy nhiên các mảnh của các miền này cũng như các polypeptit khác có thể được sử dụng thay thế cho nhau (xem, ví dụ, các hình vẽ Fig. 3A và Fig. 3B, Công bố đơn Mỹ số 2013-0295121; 2010-0174053 và 2009-0060910; Công bố đơn Châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Do đó, ví dụ, thay vì miền CH1, người có hiểu biết trung bình có thể sử dụng peptit có trình tự axit amin GVEPKSC (SEQ ID NO:96) VEPKSC (SEQ ID NO:97), hoặc AEPKSC (SEQ ID NO:98), có nguồn gốc từ miền bản lề của IgG người, và thay vì miền CL, người có hiểu biết trung bình có thể sử dụng 6 axit amin đầu tận C của chuỗi nhẹ kapa người, GFNRGEC (SEQ ID NO:99) hoặc FNRGEC (SEQ ID NO:100). Kháng tổ hợp kép bốn chuỗi chứa peptit đại diện được thể hiện trên Fig.

3A. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, người có hiểu biết trung bình có thể sử dụng peptit chứa các miền vòng xoắn liền kề có điện tích trái dấu như miền xoắn "vòng xoắn E" (SEQ ID NO:101: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK hoặc SEQ ID NO:103: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); và miền "vòng xoắn K" (SEQ ID NO:102: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE hoặc SEQ ID NO:104: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). Miền vòng xoắn đại diện chứa kháng tổ hợp kép bốn chuỗi được thể hiện trên Fig. 3B.

Phân tử kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc theo sáng chế thường bao gồm các peptit liên kết xen giữa (tác nhân liên kết) bổ sung. Thông thường, các tác nhân liên kết bổ sung chứa từ 3 đến 20 gốc axit amin. Tác nhân liên kết bổ sung hoặc thay thế có thể được sử dụng trong phân tử kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc theo sáng chế bao gồm: GGGS (SEQ ID NO:90), LGGGSG (SEQ ID NO:91), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:92), ASTKG (SEQ ID NO:93), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:109), LEPKSS (SEQ ID NO:94), APSSS (SEQ ID NO:95), và APSSSPME (SEQ ID NO:110), LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:111), GGC, và GGG. SEQ ID NO:94 có thể được sử dụng thay cho GGG hoặc GGC để dễ tách dòng. Ngoài ra, axit amin GGG, hoặc SEQ ID NO:94 có thể ở ngay trước SEQ ID NO:109 để tạo ra tác nhân liên kết thay thế: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:112); và LEPKSSDKTHTCPPCP; (SEQ ID NO:113). Phân tử kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc theo sáng chế có thể kết hợp vùng bản lề của IgG ngoài hoặc ở vị trí của tác nhân liên kết. Vùng bản lề được nêu làm ví dụ bao gồm: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:114) từ IgG1, ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO:115) từ IgG2, ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:116) từ IgG4, và ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:117) biến thể bản lề IgG4 chứa phần thay thế ổn định để làm giảm sự trao đổi chuỗi.

Như được nêu trên các hình vẽ từ Fig. 3A đến Fig. 3C, các kháng tổ hợp kép theo sáng chế có thể chứa bốn chuỗi khác nhau. Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của kháng tổ hợp kép này chứa ba miền: (i) miền chứa VL1, (ii) miền chứa VH2, (iii) miền kích thích heterodime và (iv) miền chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư chứa: (i) miền chứa VL2, (ii) miền chứa VH1 và (iii)

miền kích thích heterodime, tại đó miền kích thích heterodime thúc đẩy sự dime hóa của chuỗi polypeptit thứ nhất/thứ ba với chuỗi polypeptit thứ hai/thứ tư. Miền VL và/hoặc miền VH của chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư, và miền VL và/hoặc miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể giống hoặc khác nhau để cho phép sự liên kết bốn giá là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu bốn. Ký hiệu "VL3" và "VH3" lần lượt chỉ, miền chuỗi nhẹ biến đổi và miền chuỗi nặng biến đổi liên kết epitop "thứ ba" của kháng tổ hợp kép này ("Epitop 3"). Tương tự, ký hiệu "VL4" và "VH4" lần lượt chỉ, miền chuỗi nhẹ biến đổi và miền chuỗi nặng biến đổi liên kết epitop "thứ tư" của kháng tổ hợp kép này ("Epitop 4"). Cấu trúc tổng quát của chuỗi polypeptit của kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc bốn chuỗi đại diện theo sáng chế được nêu trong Bảng 2:

| Bảng 2 | | |
|---|---|---|
| Đặc hiệu kép | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| Đặc hiệu bốn | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ tư | $NH_2$-VL4-VH3-HPD-COOH |

HPD = miền kích thích heterodime

Theo một phương án cụ thể, các kháng tổ hợp kép theo sáng chế là kháng tổ hợp kép chứa Fc đặc hiệu kép, bốn giá (nghĩa là, có bốn vị trí liên kết epitop), (các hình vẽ từ Fig. 3A đến Fig. 3C) bao gồm tổng cộng bốn chuỗi polypeptit. Kháng tổ hợp kép chứa Fc đặc hiệu kép, bốn giá theo sáng chế bao gồm hai vị trí liên kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với LAG-3 (có thể có khả năng liên kết với cùng một epitop của LAG-3 hoặc các epitop khác nhau của LAG-3), và hai vị trí liên kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.*).

Theo một phương án khác, kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc đặc hiệu kép có thể chứa ba chuỗi polypeptit. Polypeptit thứ nhất của kháng tổ hợp kép này chứa ba miền: (i) miền chứa VL1, (ii) miền chứa VH2 và (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3. Polypeptit thứ hai của kháng tổ hợp kép này chứa: (i) miền chứa VL2, (ii) miền chứa VH1 và (iii) miền kích thích heterodime hóa và liên kết cộng hóa trị với chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng tổ hợp kép đó. Polypeptit thứ ba của kháng tổ hợp kép này chứa trình tự CH2-CH3. Vì vậy, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của các kháng tổ hợp kép này kết hợp với nhau để tạo ra vị trí liên kết VL1/VH1 có khả năng liên kết với epitop thứ nhất, cũng như vị trí liên kết VL2/VH2 có khả năng liên kết với epitop thứ hai. Polypeptit thứ nhất và thứ hai liên kết với một polypeptit khác thông qua liên kết disulfua gồm các gốc xystein trong miền thứ ba tương ứng của chúng. Lưu ý, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với một chuỗi polypeptit khác để tạo ra vùng Fc được làm ổn định thông qua liên kết disulfua. Các kháng tổ hợp kép này có hoạt lực tăng cường. Các hình vẽ Fig. 4A và Fig. 4B minh họa cấu trúc của kháng tổ hợp kép này. Kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép chứa vùng Fc này có thể có một trong hai hướng (Bảng 3):

| Bảng 3 | | |
|---|---|---|
| Hướng thứ nhất | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| Hướng thứ hai | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |

HPD = miền kích thích heterodime

Theo một phương án cụ thể, các kháng tổ hợp kép theo sáng chế là kháng tổ hợp kép chứa Fc đặc hiệu kép, hai giá (nghĩa là, có hai vị trí liên kết epitop), (các hình vẽ từ Fig. 4A đến Fig. 4B) bao gồm tổng cộng ba chuỗi polypeptit. Kháng tổ hợp kép chứa Fc đặc hiệu kép, hai giá theo sáng chế chứa một vị trí liên kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với LAG-3, và một vị trí liên kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.*).

Theo một phương án khác, kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc đặc hiệu kép có thể chứa tổng cộng năm chuỗi polypeptit. Theo một phương án cụ thể, hai trong số năm chuỗi polypeptit này có cùng trình tự axit amin. Chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng tổ hợp kép này chứa: (i) miền chứa VH1, (ii) miền chứa CH1, và (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ nhất có thể là chuỗi nặng của kháng thể chứa VH1 và vùng hằng định chuỗi nặng. Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của kháng tổ hợp kép này chứa: (i) miền chứa VL1, và (ii) miền chứa CL. Chuỗi polypeptit thứ hai và/hoặc thứ năm của kháng tổ hợp kép này có thể là chuỗi nhẹ của kháng thể chứa VL1 bổ sung cho VH1 của chuỗi polypeptit thứ nhất/thứ ba. Chuỗi polypeptit thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ năm có thể được phân lập khỏi các kháng thể có trong tự nhiên. Theo một cách khác, chúng có thể được xây dựng cấu trúc theo cách tái tổ hợp. Chuỗi polypeptit thứ ba của kháng tổ hợp kép này chứa: (i) miền chứa VH1, (ii) miền chứa CH1, (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3, (iv) miền chứa VL2, (v) miền chứa VH3 và (vi) miền kích thích heterodime, tại đó miền kích thích heterodime này thúc đẩy sự dime hóa của chuỗi thứ ba với chuỗi thứ tư. Polypeptit thứ tư của kháng tổ hợp kép này chứa: (i) miền chứa VL3, (ii) miền chứa VH2 và (iii) miền kích thích heterodime hóa và liên kết cộng hóa trị với chuỗi polypeptit thứ ba của kháng tổ hợp kép đó.

Vì vậy, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, và thứ ba và thứ năm của kháng tổ hợp kép này kết hợp với nhau để tạo ra hai vị trí liên kết VL1/VH1 có khả năng liên kết với epitop thứ nhất. Chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư của kháng tổ hợp kép này kết hợp với nhau để tạo ra vị trí liên kết VL2/VH2 có khả năng liên kết với epitop thứ hai, cũng như vị trí liên kết VL3/VH3 có khả năng liên kết với epitop thứ ba. Polypeptit thứ nhất và thứ ba liên kết với một polypeptit khác thông qua liên kết disulfua gồm các gốc xystein ở các vùng hằng định tương ứng của chúng. Lưu ý, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với một chuỗi polypeptit khác để tạo ra vùng Fc. Các kháng tổ hợp kép này có hoạt lực tăng cường. Fig. 5 minh họa cấu trúc của các kháng tổ hợp kép này. Cần hiểu rằng các miền VL1/VH1, VL2/VH2, và VL3/VH3 có thể giống hoặc khác nhau để cho phép liên kết là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu ba. Tuy nhiên, như được đề xuất trong bản mô tả, các miền này tốt hơn là được chọn lọc để liên kết với LAG-3 và epitop thứ hai (hoặc epitop

thứ hai và thứ ba (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.*). Epitop thứ hai và thứ ba có thể là các epitop khác nhau của cùng một phân tử kháng nguyên, hoặc có thể là epitop của các phân tử kháng nguyên khác nhau. Các khía cạnh như vậy của sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây.

Vì vậy, miền VL và VH của chuỗi polypeptit được lựa chọn để tạo ra vị trí liên kết VL/VH đặc hiệu đối với các epitop mong muốn. Vị trí liên kết VL/VH được tạo ra nhờ sự kết hợp của các chuỗi polypeptit có thể giống hoặc khác nhau để cho phép liên kết bốn giá là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép, đặc hiệu ba hoặc đặc hiệu bốn. Cụ thể, các miền VL và VH có thể được lựa chọn sao cho kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép có thể chứa hai vị trí liên kết đối với epitop thứ nhất và hai vị trí liên kết đối với epitop thứ hai, hoặc ba vị trí liên kết đối với epitop thứ nhất và một vị trí liên kết đối với epitop thứ hai, hoặc hai vị trí liên kết đối với epitop thứ nhất, một vị trí liên kết đối với epitop thứ hai và một vị trí liên kết đối với epitop thứ ba (như được thể hiện trên Fig. 5). Cấu trúc tổng quát của chuỗi polypeptit của kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc năm chuỗi đại diện theo sáng chế được nêu trong Bảng 4:

| Bảng 4 | | |
|---|---|---|
| Đặc hiệu kép (2x2) | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL1-CL-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ năm | $NH_2$-VL1-CL-COOH |
| | Chuỗi thứ tư | $NH_2$-VL2-VH2-HPD-COOH |
| Đặc hiệu kép (3x1) | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL1-CL-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ năm | $NH_2$-VL1-CL-COOH |
| | Chuỗi thứ tư | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| Đặc hiệu ba (2x1x1) | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL1-CL-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ năm | $NH_2$-VL1-CL-COOH |
| | Chuỗi thứ tư | $NH_2$-VL3-VH2-HPD-COOH |

HPD = miền kích thích heterodime

Theo một phương án cụ thể, các kháng tổ hợp kép theo sáng chế là kháng tổ hợp kép chứa Fc đặc hiệu kép, bốn giá (nghĩa là, có bốn vị trí liên kết epitop) bao gồm tổng cộng năm chuỗi polypeptit có hai vị trí liên kết đối với epitop thứ nhất và hai vị trí liên kết đối với epitop thứ hai. Theo một phương án, kháng tổ hợp kép chứa Fc đặc hiệu kép, bốn giá theo sáng chế chứa hai vị trí liên kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với LAG-3 (có thể có khả năng liên kết với cùng một epitop của LAG-3 hoặc các epitop khác nhau của LAG-3), và hai vị trí liên kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.)*. Theo một phương án khác, kháng tổ hợp kép chứa Fc đặc hiệu kép, bốn giá theo sáng chế chứa ba vị trí liên kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với LAG-3 (có thể có khả năng liên kết với cùng một epitop của LAG-3 hoặc với các epitop khác nhau của LAG-3), và một vị trí liên kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc

II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.)*. Theo một phương án khác, kháng tổ hợp kép chứa Fc đặc hiệu kép, bốn giá theo sáng chế chứa một vị trí liên kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với LAG-3, và ba vị trí liên kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.)*.

3. Phân tử liên kết đặc hiệu kép ba giá chứa vùng Fc

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến phân tử liên kết đặc hiệu kép, ba giá, chứa vùng Fc, và có khả năng liên kết đồng thời với epitop thứ nhất, epitop thứ hai và epitop thứ ba, trong đó ít nhất một trong các epitop này không giống hệt với một epitop khác trong số các epitop này. Do đó, kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép này chứa miền "VL1"/"VH1" có khả năng liên kết với epitop thứ nhất, miền "VL2"/"VH2" có khả năng liên kết với epitop thứ hai và miền "VL3"/"VH3" có khả năng liên kết với epitop thứ ba. Theo một phương án, một hoặc hai trong số các epitop này là epitop của LAG-3 và một epitop khác (hoặc epitop còn lại) trong số các epitop này không phải là epitop của LAG-3 (ví dụ, epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.). Phân tử liên kết đặc hiệu kép ba giá này chứa ba vị trí liên kết epitop, hai trong số đó là miền liên kết kiểu kháng tổ hợp kép, tạo ra vị trí liên kết A và vị trí liên kết B, và một trong số đó là miền liên kết kiểu không phải kháng tổ hợp kép, tạo ra vị trí liên kết C (xem, ví dụ, các hình vẽ từ Fig. 6A đến Fig. 6F, và đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số: PCT/US15/33081; và PCT/US15/33076).

Thông thường, phân tử liên kết ba giá theo sáng chế chứa bốn chuỗi polypeptit khác nhau (xem các hình vẽ từ Fig. 6A đến Fig. 6B), tuy nhiên, các phân tử này có thể chứa số lượng chuỗi polypeptit ít hơn hoặc nhiều hơn, ví dụ, bằng cách dung hợp chuỗi polypeptit này với một chuỗi polypeptit khác (ví dụ, thông qua liên kết peptit) hoặc bằng cách "phân chia" chuỗi polypeptit này để tạo ra chuỗi polypeptit bổ sung, hoặc bằng cách kết hợp chuỗi polypeptit ít hơn hoặc bổ sung thông qua liên kết disulfua. Các hình vẽ Fig. 6B đến Fig. 6F minh họa khía cạnh này của sáng chế bằng cách thể hiện sơ lược các phân tử có ba chuỗi polypeptit như vậy. Như được thể hiện

trên các hình vẽ Fig. 6A đến Fig. 6F, phân tử liên kết ba giá theo sáng chế có thể có các hướng thay thế trong đó miền liên kết kiểu kháng tổ hợp kép là đầu tận N (các hình vẽ Fig. 6A, Fig. 6C và Fig. 6D) hoặc đầu tận C (các hình vẽ Fig. 6B, Fig. 6E và Fig. 6F) đối với vùng Fc.

Theo các phương án nhất định, chuỗi polypeptit thứ nhất của phân tử liên kết ba giá này theo sáng chế chứa: (i) miền chứa VL1, (ii) miền chứa VH2, (iii) miền kích thích heterodime, và (iv) miền chứa trình tự CH2-CH3. Miền VL1 và VL2 nằm ở đầu tận N hoặc đầu tận C đối với miền chứa CH2-CH3 như được nêu trong Bảng 5 (các hình vẽ Fig. 6A và Fig. 6B). Chuỗi polypeptit thứ hai theo các phương án như vậy chứa: (i) miền chứa VL2, (ii) miền chứa VH1, và (iii) miền kích thích heterodime. Chuỗi polypeptit thứ ba theo các phương án như vậy chứa: (i) miền chứa VH3, (ii) miền chứa CH1 và (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ ba có thể là chuỗi nặng của kháng thể chứa VH3 và vùng hằng định chuỗi nặng. Polypeptit thứ tư theo các phương án như vậy chứa: (i) miền chứa VL3 và (ii) miền chứa CL. Chuỗi polypeptit thứ tư có thể là chuỗi nhẹ của kháng thể chứa VL3 bổ sung vào VH3 của chuỗi polypeptit thứ ba. Chuỗi polypeptit thứ ba hoặc thứ tư có thể được phân lập khỏi các kháng thể có trong tự nhiên. Theo một cách khác, chúng có thể được xây dựng cấu trúc theo cách tái tổ hợp, tổng hợp hoặc bằng phương tiện khác.

Miền chuỗi nhẹ biến đổi của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai được tách ra khỏi miền chuỗi nặng biến đổi của chuỗi polypeptit này bằng tác nhân liên kết đệm xen giữa có chiều dài quá ngắn để cho phép miền VL1/VH2 của chúng (hoặc VL2/VH1 của chúng) kết hợp với nhau để tạo ra vị trí liên kết epitop có khả năng liên kết với epitop thứ nhất hoặc epitop thứ hai. Peptit đệm xen giữa được ưu tiên (tác nhân liên kết 1) cho mục đích này có trình tự (SEQ ID NO:14): GGGSGGGG. Các miền khác của phân tử liên kết ba giá có thể được tách ra bởi một hoặc nhiều peptit đệm xen giữa, tùy ý chứa gốc xystein. Các tác nhân liên kết nêu làm ví dụ hữu ích để tạo ra phân tử liên kết ba giá được đề cập trong bản mô tả và cũng được đề cập trong Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số: PCT/US15/33081; và PCT/US15/33076. Vì vậy, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của phân tử liên kết ba giá này kết hợp với nhau để tạo ra vị trí liên kết VL1/VH1 có khả năng liên

kết với epitop thứ nhất, cũng như vị trí liên kết VL2/VH2 có khả năng liên kết với epitop thứ hai. Chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư của phân tử liên kết ba giá này kết hợp với nhau để tạo ra vị trí liên kết VL3/VH3 có khả năng liên kết với epitop thứ ba.

Như được mô tả ở trên, phân tử liên kết ba giá theo sáng chế có thể chứa ba polypeptit. Phân tử liên kết ba giá chứa ba chuỗi polypeptit này có thể thu được bằng cách liên kết các miền của đầu tận N của polypeptit thứ tư với miền chứa VH3 của polypeptit thứ ba. Theo cách khác, chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử liên kết ba giá theo sáng chế chứa ba miền sau được sử dụng: (i) miền chứa VL3, (ii) miền chứa VH3, và (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3, trong đó VL3 và VH3 được đặt cách xa khỏi một miền khác bởi peptit đệm xen giữa đủ dài (ít nhất 9 gốc axit amin hoặc nhiều hơn) để cho phép kết hợp các miền này để tạo ra vị trí liên kết epitop.

Cần hiểu rằng các miền VL1/VH1, VL2/VH2, và VL3/VH3 của phân tử kháng tổ hợp kép này có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép liên kết mà là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu ba. Tuy nhiên, như được đề cập trong bản mô tả này, các miền này tốt hơn là được chọn lọc để liên kết LAG-3 và epitop thứ hai (hoặc epitop thứ hai và epitop thứ ba) (tốt hơn là, các epitop này là epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.).

Cụ thể, miền VL và miền VH có thể được chọn lọc sao cho phân tử liên kết ba giá chứa hai vị trí liên kết đối với epitop thứ nhất và một vị trí liên kết đối với epitop thứ hai, hoặc một vị trí liên kết đối với epitop thứ nhất và hai vị trí liên kết đối với epitop thứ hai, hoặc một vị trí liên kết đối với epitop thứ nhất, một vị trí liên kết đối với epitop thứ hai và một vị trí liên kết đối với epitop thứ ba. Cấu trúc tổng quát của chuỗi polypeptit của phân tử liên kết ba giá đại diện theo sáng chế được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 6A đến Fig. 6F và trong Bảng 5:

| Bảng 5 | | |
|---|---|---|
| Hướng thứ nhất bốn chuỗi | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ tư | $NH_2$-VL3-CL-COOH |
| Hướng thứ hai bốn chuỗi | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH |
| | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ tư | $NH_2$-VL3-CL-COOH |
| Hướng thứ nhất ba chuỗi | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
| | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH |
| Hướng thứ hai ba chuỗi | Chuỗi thứ hai | $NH_2$-VL2-VH1-HPD-COOH |
| | Chuỗi thứ nhất | $NH_2$-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH |
| | Chuỗi thứ ba | $NH_2$-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH |

HPD = miền kích thích heterodime

Một phương án theo sáng chế đề cập đến phân tử liên kết đặc hiệu kép ba giá chứa hai vị trí liên kết epitop đối với LAG-3 và một vị trí liên kết epitop đối với epitop thứ hai có mặt trên phân tử khác với LAG-3 (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.)*. Hai vị trí liên kết epitop đối với LAG-3 có thể liên kết với cùng một epitop hoặc các epitop khác nhau. Một phương án khác của sáng chế đề cập đến phân tử liên kết đặc hiệu kép ba giá chứa, một vị trí liên kết epitop đối với LAG-3 và hai vị trí liên kết epitop liên kết kháng nguyên thứ hai có mặt trên phân tử khác với LAG-3 (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v.)*. Hai vị trí liên kết epitop đối với kháng nguyên thứ hai có thể liên kết với cùng một epitop hoặc các epitop khác nhau của kháng nguyên (ví dụ, các epitop giống hoặc khác nhau của LAG-3). Như được đề cập ở trên, phân tử liên kết đặc hiệu kép ba giá này có thể chứa ba hoặc bốn chuỗi polypeptit.

VII. Miền hằng định và vùng Fc

Sáng chế đề cập đến miền hằng định của kháng thể hữu ích trong việc tạo ra phân tử liên kết LAG-3 (ví dụ, kháng thể, kháng tổ hợp kép, phân tử liên kết ba giá, *v.v.)* theo sáng chế.

Miền CL được ưu tiên là miền CL Kapa của IgG ở người. Trình tự axit amin của miền CL Kapa ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:118):

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC

Theo cách khác, miền CL được nêu làm ví dụ là miền CL Lamda của IgG ở người. Trình tự axit amin của miền CL Kapa ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:119):

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS

Như được đề cập trong bản mô tả này, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể chứa vùng Fc. Vùng Fc của phân tử này theo sáng chế có thể có isotyp bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4). Phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế còn có thể chứa miền CH1 và/hoặc vùng bản lề. Khi có mặt, miền CH1 và/hoặc vùng bản lề có thể có isotyp bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4), và tốt hơn là có cùng một isotyp là vùng Fc mong muốn.

Miền CH1 được nêu làm ví dụ là miền CH của IgG1 người. Trình tự axit amin của miền CH1 của IgG1 người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:120):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Miền CH1 được nêu làm ví dụ là miền CH của IgG2 người. Trình tự axit amin của miền CH1 của IgG2 người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:121):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

Miền CH1 được nêu làm ví dụ là miền CH1 của IgG4 người. Trình tự axit amin của miền CH1 của IgG4 người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:122):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

Một vùng bản lề được nêu làm ví dụ là vùng bản lề của IgG1 ở người. Trình tự axit amin của vùng bản lề của IgG1 ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:114): EPKSCDKTHTCPPCP.

Một vùng bản lề khác được nêu làm ví dụ là vùng bản lề của IgG2 ở người. Trình tự axit amin của vùng bản lề của IgG2 ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:115): ERKCCVECPPCP.

Một vùng bản lề khác được nêu làm ví dụ là vùng bản lề của IgG4 ở người. Trình tự axit amin của vùng bản lề của IgG4 ở người được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:116): ESKYGPPCPSCP. Như được mô tả ở đây, vùng bản lề của IgG4 có thể chứa đột biến ổn định như đoạn thay thế S228P. Trình tự axit amin của vùng bản lề của IgG4 được làm ổn định được nêu làm ví dụ là (SEQ ID NO:117): ESKYGPPCPPCP.

Vùng Fc của phân tử chứa vùng Fc (ví dụ, kháng thể, kháng tổ hợp kép, và phân tử ba giá) theo sáng chế có thể là vùng Fc hoàn chỉnh (ví dụ, vùng Fc của IgG hoàn chỉnh) hoặc chỉ là một mảnh của vùng Fc. Tùy ý, vùng Fc của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế thiếu gốc axit amin lysin đầu tận C. Cụ thể, vùng Fc của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có thể là vùng Fc biến thể được xử lý kỹ thuật. Mặc dù vùng Fc của phân tử chứa vùng Fc đặc hiệu kép theo sáng chế có thể có khả năng liên kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc (ví dụ, (các) FcγR), tốt hơn nữa là vùng Fc biến thể này có liên kết biến đổi với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng liên kết được biểu hiện ở vùng Fc kiểu dại) hoặc có khả năng liên kết về cơ bản giảm đi hoặc không có khả năng liên kết với (các) thụ thể ức chế. Vì vậy, vùng Fc của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có thể bao gồm phần nào hoặc toàn bộ miền CH2 và/hoặc phần nào hoặc toàn bộ miền CH3 của vùng Fc hoàn chỉnh, hoặc có thể chứa trình tự CH2 biến thể và/hoặc CH3 biến thể (có thể bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều cải biến cài xen và/hoặc một hoặc nhiều cải biến làm khuyết với các miền CH2 hoặc CH3 của vùng Fc hoàn chỉnh). Vùng Fc này có thể chứa phần polypeptit không phải

của Fc, hoặc có thể chứa các phần của vùng Fc hoàn chỉnh không có trong tự nhiên, hoặc có thể bao gồm các định hướng không có trong tự nhiên của miền CH2 và/hoặc CH3 (như, ví dụ, hai miền CH2 hoặc hai miền CH3, hoặc theo chiều từ đầu tận N đến đầu tận C, miền CH3 được liên kết với miền CH2, *v.v.)*.

Cải biến vùng Fc mà được nhận biết là làm thay đổi chức năng tác động đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các cải biến làm tăng khả năng liên kết với các thụ thể hoạt hóa (ví dụ, FcγRIIA (CD16A) và làm giảm khả năng liên kết với các thụ thể ức chế (ví dụ, FcγRIIB (CD32B) (xem, ví dụ, Stavenhagen, J.B. *et al.* (2007) "*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors*", Cancer Res. 57(18):8882-8890). Các biến thể được nêu làm ví dụ của vùng Fc của IgG1 ở người có khả năng liên kết giảm với CD32B và/hoặc khả năng liên kết tăng với CD16A chứa các đoạn thay thế F243L, R292P, Y300L, V305I hoặc P296L. Các đoạn thay thế axit amin này có thể có mặt trong vùng Fc của IgG1 ở người trong tổ hợp hoặc tổ hợp con bất kỳ. Theo một phương án, biến thể vùng Fc của IgG1 ở người chứa đoạn thay thế F243L, R292P và Y300L. Theo một phương án khác, biến thể vùng Fc của IgG1 ở người chứa các đoạn thay thế F243L, R292P, Y300L, V305I và P296L.

Cụ thể, được ưu tiên theo sáng chế là miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế để biểu hiện khả năng liên kết giảm (hoặc gần như không liên kết) với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng liên kết được biểu hiện ở vùng Fc của IgG1 kiểu dại (SEQ ID NO:1). Vùng Fc biến thể và các dạng đột biến có khả năng điều tiết sự liên kết biến đổi như vậy được mô tả ở trên. Theo một phương án cụ thể, phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế chứa vùng Fc của IgG biểu hiện chức năng tác động ADCC giảm. Theo một phương án được ưu tiên, miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất và/hoặc thứ ba của các phân tử này bao gồm 1, 2, hoặc 3 đoạn thay thế bất kỳ trong số các đoạn thay thế: L234A, L235A, N297Q, và N297G. Theo một phương án khác, biến thể vùng Fc của IgG ở người chứa đoạn thay thế N297Q, đoạn thay thế N297G, các đoạn thay thế L234A và L235A hoặc đoạn thay thế D265A, do các đột biến này loại bỏ khả năng liên kết FcR. Theo cách

khác, miền CH2-CH3 của vùng Fc mà vốn biểu hiện khả năng liên kết giảm (hoặc gần như không liên kết) với FcγRIIIA (CD16a) và/hoặc chức năng tác động giảm (so với khả năng liên kết được biểu hiện bởi vùng Fc của IgG1 kiểu dại (SEQ ID NO:1)) được sử dụng. Theo một phương án cụ thể, phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế chứa vùng Fc của IgG2 (SEQ ID NO:2) hoặc vùng Fc của IgG4 (SEQ ID:NO:4). Khi vùng Fc của IgG4 được sử dụng, sáng chế còn bao gồm việc đưa đột biến làm ổn định vào, như đoạn thay thế S228P của vùng bản lề được mô tả ở trên (xem, ví dụ, SEQ ID NO:117). Do các đoạn thay thế N297G, N297Q, L234A, L235A và D265A loại bỏ chức năng tác động, nên trong một số trường hợp trong đó chức năng tác động được mong đợi, thì các đoạn thay thế này tốt hơn là không được sử dụng.

Trình tự IgG1 được ưu tiên đối với miền CH2 và miền CH3 của phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có các đoạn thay thế L234A/L235A (SEQ ID NO:123):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt.

Cụ thể, được ưu tiên theo sáng chế là vùng Fc của chuỗi polypeptit của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế để biểu hiện thời gian bán thải trong huyết thanh tăng (so với thời gian bán thải được biểu hiện bởi Fc kiểu dại tương ứng). Vùng Fc biến thể và các dạng đột biến biểu hiện thời gian bán thải trong huyết thanh kéo dài được mô tả ở trên. Theo một phương án được ưu tiên, miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất và/hoặc thứ ba của phân tử chứa vùng Fc này bao gồm 1, 2, hoặc 3 đoạn thay thế bất kỳ trong số các đoạn thay thế: M252Y, S254T và T256E. Sáng chế còn bao gồm các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể chứa:

(A) một hoặc nhiều đột biến làm biến đổi chức năng tác động và/hoặc FcγR; và

(B) một hoặc nhiều đột biến kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh.

Trình tự IgG1 được ưu tiên đối với miền CH2 và CH3 của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế chứa các đoạn thay thế L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO:124):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt

Trình tự IgG4 được ưu tiên đối với miền CH2 và miền CH3 của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế chứa các đoạn thay thế M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO:125):

```
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt

Đối với các kháng tổ hợp kép và phân tử liên kết ba giá mà chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của nó không giống hệt nhau), mong muốn là làm giảm hoặc ngăn chặn sự homodime hóa xảy ra giữa miền CH2-CH3 của hai chuỗi polypeptit thứ nhất hoặc giữa các miền CH2-CH3 của hai chuỗi polypeptit thứ ba. Miền CH2 và/hoặc CH3 của chuỗi polypeptit này không cần giống hệt về trình tự, và thuận lợi là được cải biến để tạo điều kiện cho việc tạo phức giữa hai chuỗi polypeptit đó. Ví dụ, đoạn thay thế axit amin (tốt hơn là thay thế bằng axit amin chứa nhóm bên lớn tạo ra "phần khóa", ví dụ, tryptophan) có thể được đưa vào miền CH2 hoặc CH3 sao cho sự cản trở trong không gian sẽ ngăn chặn sự tương tác với miền đột biến tương tự và ép miền đột biến này bắt cặp với miền mà đột biến bổ trợ, hoặc bổ sung vào đó, đã được xử lý kỹ thuật, nghĩa là, "phần ổ" (ví dụ, đoạn thay thế bằng glyxin). Tập hợp các đột biến như vậy có thể được xử lý kỹ thuật thành cặp polypeptit bất kỳ chứa miền CH2-CH3 mà tạo ra vùng Fc. Phương pháp xử lý kỹ thuật protein để tạo thuận lợi cho việc heterodime hóa so với homodime hóa là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật

này, đặc biệt là đối với việc xử lý kỹ thuật các phân tử giống globulin miễn dịch, và được bao gồm trong bản mô tả này (xem ví dụ, Ridgway *et al.* (1996) *"'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization"*, Protein Engr. 9:617-621, Atwell *et al.* (1997) *"Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library"*, J. Mol. Biol. 270: 26-35, và Xie *et al.* (2005) *"A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis"*, J. Immunol. Methods 296:95-101; mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Tốt hơn là "phần khóa" được xử lý kỹ thuật thành miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất và "phần ổ" được xử lý kỹ thuật thành miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ ba của kháng tổ hợp kép chứa ba chuỗi polypeptit. Vì vậy, "phần khóa" sẽ hỗ trợ việc ngăn chặn chuỗi polypeptit thứ nhất homodime hóa thông qua miền CH2 và/hoặc CH3 của nó. Do chuỗi polypeptit thứ ba tốt hơn là chứa đoạn thay thế "ổ", nên nó sẽ heterodime hóa với chuỗi polypeptit thứ nhất cũng như homodime hóa với chính nó. Chiến lược này có thể được sử dụng cho các kháng tổ hợp kép và phân tử liên kết ba giá chứa ba, bốn hoặc năm chuỗi như được nêu chi tiết ở trên, trong đó "phần khóa" được xử lý kỹ thuật thành miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất và "phần ổ" được xử lý kỹ thuật thành miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ ba.

Phần khóa ưu tiên được tạo ra bằng cách cải biến vùng Fc của IgG để chứa cải biến T366W. Phần ổ ưu tiên được tạo ra bằng cách cải biến vùng Fc của IgG để chứa cải biến T366S, L368A và Y407V. Để hỗ trợ việc tinh chế homodime của chuỗi polypeptit thứ ba mang phần ổ từ phân tử chứa vùng Fc dạng heterodime đặc hiệu kép cuối cùng, thì vị trí liên kết protein A của miền CH2 và CH3 của chuỗi polypeptit thứ ba tốt hơn là được tạo đột biến bằng đoạn thay thế axit amin ở vị trí 435 (H435R). Vì vậy, homodime của chuỗi polypeptit thứ ba mang phần ổ không liên kết với protein A, trong khi đó heterodime đặc hiệu kép sẽ vẫn giữ được khả năng liên kết với protein A của nó thông qua vị trí liên kết protein A trên chuỗi polypeptit thứ nhất. Theo một phương án thay thế, chuỗi polypeptit thứ ba mang phần ổ có thể kết hợp các đoạn thay thế axit amin ở vị trí 434 và 435 (N434A/N435K).

Trình tự axit amin của IgG1 được ưu tiên đối với miền CH2 và CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có trình tự "mang phần khóa" (SEQ ID NO:126):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt

Trình tự axit amin của IgG1 được ưu tiên đối với miền CH2 và CH3 của chuỗi polypeptit thứ hai của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có hai chuỗi polypeptit (hoặc chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử chứa vùng Fc có ba, bốn, hoặc năm chuỗi polypeptit) sẽ có trình tự "mang phần ổ" (SEQ ID NO:127):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGX
```

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt

Cần phải lưu ý rằng miền CH2-CH3 nêu trong SEQ ID NO:126 và SEQ ID NO:127 bao gồm đoạn thay thế ở vị trí 234 bằng alanin và 235 bằng alanin, và do đó tạo ra vùng Fc biểu hiện khả năng liên kết giảm (hoặc gần như không liên kết) với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng liên kết được biểu hiện bởi vùng Fc kiểu dại (SEQ ID NO:1). Sáng chế còn bao gồm miền CH2-CH3 như vậy, chứa gốc alanin ở vị trí 234 và/hoặc 235 và/hoặc các đoạn thay thế khác và/hoặc bổ sung mà cải biến chức năng tác động và/hoặc hoạt tính liên kết FγR của vùng Fc. Sáng chế còn bao gồm miền CH2-CH3 như vậy, còn chứa một hoặc nhiều đoạn thay thế axit amin kéo dài thời gian bán thải. Cụ thể, sáng chế bao gồm miền CH2-CH3 mang phần ổ như vậy và mang phần khóa như vậy còn chứa M252Y/S254T/T256E.

Tốt hơn là chuỗi polypeptit thứ nhất sẽ có trình tự CH2-CH3 "mang phần khóa", như trình tự SEQ ID NO:126. Tuy nhiên, cần nhận ra rằng miền CH2-CH3 "mang phần ổ" (ví dụ, SEQ ID NO:127) có thể được sử dụng trong chuỗi polypeptit thứ nhất, trong trường hợp đó, miền CH2-CH3 "mang phần khóa" (ví dụ, SEQ ID NO:126) được sử dụng trong chuỗi polypeptit thứ hai của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có hai chuỗi polypeptit (hoặc chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử chứa vùng Fc có ba, bốn, hoặc năm chuỗi polypeptit).

Như được nêu chi tiết ở trên, sáng chế bao gồm phân tử chứa vùng Fc (ví dụ, các kháng thể và kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc) có miền CH2 và miền CH3 kiểu dại, hoặc có miền CH2 và miền CH3 chứa tổ hợp của các đoạn thay thế được mô tả ở trên. Trình tự axit amin được nêu làm ví dụ của miền CH2-CH3 của IgG1chứa biến thể như vậy là (SEQ ID NO:128):

| | | | |
|---|---|---|---|
| APE$X_1X_2$GGPSV | FLFPPKPKDT | L$X_3$I$X_4$R$X_5$PEVT | CVVVDVSHED |
| PEVKFNWYVD | GVEVHNAKTK | PREEQYNSTY | RVVSVLTVLH |
| QDWLNGKEYK | CKVSNKALPA | PIEKTISKAK | GQPREPQVYT |
| LPPSREEMTK | NQVSL$X_6$C$X_7$VK | GFYPSDIAVE | WESNGQPENN |
| YKTTPPVLDS | DGSFFL$X_8$SKL | TVDKSRWQQG | NVFSCSVMHE |
| ALH$X_9X_{10}$YTQKS | LSLSPG$X_{11}$ | | |

trong đó:

(a) $X_1$ và $X_2$ đều là L (kiểu dại), hoặc đều là A (liên kết FcγR giảm);

(b) $X_3$, $X_4$, và $X_5$ lần lượt là M, S và T (kiểu dại), hoặc là Y, T và E (thời gian bán thải kéo dài),

(c) $X_6$, $X_7$, và $X_8$ lần lượt là T, L và Y (kiểu dại), hoặc là W, L và Y (phần khóa), hoặc S, A và V (phần ổ);

(d) $X_9$ và $X_{10}$ lần lượt là N và H (kiểu dại), hoặc là N và R (không liên kết protein A), hoặc A và K (không liên kết protein A); và

(e) $X_{11}$ là K hoặc không có mặt

Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm phân tử liên kết LAG-3 chứa miền CH2 và/hoặc CH3 đã được xử lý kỹ thuật để tạo thuận lợi cho việc heterodime hóa hơn so với homodime hóa bằng cách sử dụng các đột biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các đột biến được bộc lộ trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

VIII. Kháng thể tham chiếu

A. Kháng thể kháng LAG-3 tham chiếu

Để đánh giá và mô tả phân tử liên kết kháng LAG-3 mới theo sáng chế, kháng thể tham chiếu sau được sử dụng: 25F7 (BMS-986016, Medarex/BMS, được ký hiệu trong bản mô tả là "LAG-3 mAb A").

I. 25F7 ("LAG-3 mAb A")

Trình tự axit amin của miền VH của 25F7 ("LAG-3 mAb A") (SEQ ID NO:129) được thể hiện dưới đây (gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
INHNGNTNSN PSLKSRVTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS
DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của 25F7 ("LAG-3 mAb A") (SEQ ID NO:130) được thể hiện dưới đây (gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
GTNLEIK

B. Kháng thể kháng PD-1 tham chiếu

Để đánh giá và mô tả hoạt tính của phân tử liên kết LAG-3 mới theo sáng chế kết hợp với kháng thể kháng PD-1, thì kháng thể tham chiếu có thể được sử dụng. Các kháng thể đặc hiệu miễn dịch đối với PD-1 là đã biết (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 8008449; 8552154; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/135408; WO 2012/145549; và WO 2013/014668) và bao gồm: nivolumab (còn được biết đến là 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106, và được bán dưới tên OPDIVO® bởi Bristol-Myers Squibb) được ký hiệu trong bản mô tả là "PD-1 mAb 1"; pembrolizumab (trước đây được biết đến là lambrolizumab, còn được biết đến là MK-3475, SCH-900475, và được bán dưới tên KEYTRUDA® bởi Merck) được ký hiệu trong bản mô tả là "PD-1 mAb 2"; EH12.2H7 (Dana Farber) được ký hiệu trong bản mô tả là "PD-1 mAb 3"; pidilizumab (còn được biết đến là CT-011, CureTech,) được ký hiệu trong bản mô tả là "PD-1 mAb 4".

1. Nivolumab ("PD-1 mAb 1")

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của PD-1 mAb 1 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:131) (các gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGTLVT VSS

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 1 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:132) (các gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
GTKVEIK

2. Pembrolizumab ("PD-1 mAb 2")

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của PD-1 mAb 2 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:133) (gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 2 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:134) (gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
TFGGGTKVEIK

3. EH12.2H7 ("PD-1 mAb 3")

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của PD-1 mAb 3 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:135) (gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARWR
DSSGYHAMDY WGQGTSVTVSS

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 3 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:136) (gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRASQSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL
LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY
TFGGGTKLEI K

4. Pidilizumab ("PD-1 mAb 4")

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của PD-1 mAb 4 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:137) (gốc $CDR_H$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMYFCVRVG
YDALDYWGQG TLVTVSS

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 4 có trình tự axit amin (SEQ ID NO:138) (gốc $CDR_L$ được thể hiện bằng cách gạch chân):

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG
TKLEIK

IX. Phương pháp sản xuất

Polypeptit kháng LAG-3, và các chất chủ vận, chất đối kháng và chất điều biến LAG-3 khác có thể được tạo ra từ polynucleotit và/hoặc trình tự của các kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, tổng hợp hoặc tái tổ hợp. Một phương pháp sản xuất chất chủ vận, chất đối kháng và chất điều biến peptit này bao gồm tổng hợp hóa học polypeptit, sau đó đến xử lý trong các điều kiện oxy hóa thích hợp để thu được cấu hình tự nhiên, tức là, liên kết disulfua chính xác. Quy trình này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Kelley, R. F. *et al.* (1990) In: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M *et al.* (1984) SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; xem cả trong các Patent Mỹ số 4105603; 3972859; 3842067; và 3862925).

Polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra một cách thuận lợi bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptit pha rắn (Merrifield, B. (1986) "S*olid Phase Synthesis*", Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*", Proc. Natl.

Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*", Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

Theo một cách khác nữa, các kháng thể người đầy đủ có một hoặc nhiều CDR trong số các CDR của LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 hoặc cạnh tranh với LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 để liên kết với LAG-3 người hoặc dạng có thể hòa tan của nó có thể thu được thông qua việc sử dụng chuột nhắt có bán trên thị trường mà đã được xử lý kỹ thuật để biểu hiện protein globulin miễn dịch người đặc hiệu. Động vật chuyển gen được thiết kế để tạo ra đáp ứng miễn dịch thích hợp hơn (ví dụ, kháng thể người đầy đủ) hoặc đáp ứng miễn dịch mạnh hơn cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể của người. Các ví dụ về kỹ thuật này là XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) và HUMAB-MOUSE® và TC MOUSE™ (cả hai đều từ Medarex, Inc., Princeton, NJ).

Theo cách khác, các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp và được biểu hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng cách phân lập trước tiên là các kháng thể có được từ động vật chủ, thu được trình tự gen, và sử dụng trình tự gen này để biểu hiện kháng thể theo cách tái tổ hợp trong tế bào chủ (ví dụ, tế bào CHO). Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng là biểu hiện trình tự kháng thể ở cây trồng (ví dụ, cây thuốc lá) hoặc sữa chuyển gen. Các phương pháp thích hợp để biểu hiện kháng thể theo cách tái tổ hợp ở cây trồng hoặc sữa đã được bộc lộ (xem, ví dụ, Peeters *et al.* (2001) "*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*", Vaccine 19:2756; Lonberg, N. *et al.* (1995) "*Human Antibodies From Transgenic Mice*", Int. Rev. Immunol 13:65-93; và Pollock *et al.* (1999) "*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*", J. Immunol Methods 231:147-157). Các phương pháp thích hợp để tạo ra các dẫn xuất của kháng thể, ví dụ, được làm giống như của người, chuỗi đơn, *v.v.* là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo cách khác, các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể (xem, ví dụ, Patent

Mỹ số 5565332; 5580717; 5733743; 6265150; và Winter, G. *et al.* (1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*", Annu. Rev. Immunol. 12.433-455).

Các kháng thể hoặc protein đang quan tâm có thể được giải trình tự bằng kỹ thuật thoái biến Edman, đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông tin về peptit thu được từ phương pháp phổ khối hoặc thoái biến Edman có thể được sử dụng để thiết kế đầu dò hoặc mồi mà được sử dụng để tách dòng protein đang quan tâm.

Một phương pháp khác để tách dòng protein đang quan tâm là bằng cách "phân tích trọng lượng" sử dụng LAG-3 tinh chế hoặc các phần của nó đối với các tế bào biểu hiện kháng thể hoặc protein đang quan tâm mà có một hoặc nhiều CDR trong số các CDR LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 hoặc cạnh tranh với LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 để liên kết với LAG-3 người. Quy trình "phân tích trọng lượng" có thể được tiến hành bằng cách thu thư viện ADN bổ sung từ các mô hoặc tế bào biểu hiện LAG-3, biểu hiện quá mức ADN bổ sung thuộc kiểu tế bào thứ hai, và sàng lọc các tế bào được chuyển nhiễm thuộc kiểu tế bào thứ hai để liên kết đặc hiệu với LAG-3 khi có hoặc không có LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6. Phần mô tả chi tiết về các phương pháp được sử dụng để tách dòng gen động vật có vú mã hóa protein bề mặt tế bào bằng cách "phân tích trọng lượng" có thể được tìm thấy trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Aruffo, A. *et al.* (1987) "*Molecular Cloning Of A CD28 cADN By A High-Efficiency COS Cell Expression System*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 và Stephan, J. *et al.* (1999) "*Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation*", Endocrinol. 140:5841-5854).

Vectơ chứa polynucleotit đang quan tâm có thể được đưa vào tế bào chủ bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp thích hợp, bao gồm phương pháp điện di, phương pháp chuyển nhiễm sử dụng canxi clorua, rubidi clorua, canxi phosphat, DEAE-dextran, hoặc các chất khác; bắn phá bằng đạn nhỏ; chuyển nhiễm

liposom; và lây nhiễm (ví dụ, khi vectơ là tác nhân lây nhiễm như virut đậu mùa). Việc lựa chọn vectơ hoặc polynucleotit đưa vào sẽ phụ thuộc vào các đặc điểm của tế bào chủ.

Tế bào chủ bất kỳ có khả năng biểu hiện quá mức ADN khác loại có thể được sử dụng nhằm mục đích phân lập các gen mã hóa kháng thể, polypeptit hoặc protein đang quan tâm. Các ví dụ không giới hạn về tế bào chủ của động vật có vú thích hợp bao gồm nhưng không giới hạn ở các tế bào COS, HeLa, và CHO. Tốt hơn là, tế bào chủ biểu hiện ADN bổ sung ở nồng độ cao hơn khoảng 5 lần, tốt hơn nữa là cao hơn 10 lần, thậm chí tốt hơn nữa là cao hơn 20 lần so với nồng độ của kháng thể hoặc protein nội sinh tương ứng đang quan tâm, nếu có, trong tế bào chủ. Việc sàng lọc tế bào chủ để liên kết đặc hiệu với LAG-3 được tác động bởi thử nghiệm miễn dịch hoặc FACS. Tế bào biểu hiện quá mức kháng thể hoặc protein đang quan tâm có thể được nhận biết.

Sáng chế bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế này. Polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Polypeptit có thể được sản xuất bằng cách phân giải protein hoặc các kỹ thuật khác để làm thoái biến kháng thể, bằng phương pháp tái tổ hợp (nghĩa là, polypeptit đơn hoặc polypeptit dung hợp) như được mô tả ở trên hoặc bằng cách tổng hợp hóa học. Polypeptit của kháng thể, đặc biệt là polypeptit ngắn hơn lên đến khoảng 50 axit amin, được tạo ra một cách thuận lợi bằng cách tổng hợp hóa học. Các phương pháp tổng hợp hóa học đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có sẵn trên thị trường. Ví dụ, polypeptit kháng LAG-3 có thể được sản xuất bằng thiết bị tổng hợp polypeptit tự động sử dụng phương pháp pha rắn.

Sáng chế bao gồm các biến thể của kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 và các mảnh polypeptit của chúng mà liên kết với LAG-3, bao gồm các kháng thể tương đương về mặt chức năng và polypeptit dung hợp mà không ảnh hưởng đáng kể đến các tính chất của các phân tử này cũng như các biến thể mà có hoạt tính tăng cường hoặc giảm đi. Việc cải biến polypeptit là phương pháp thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này và không cần được mô tả chi tiết trong bản mô tả. Các ví dụ về các

polypeptit đã cải biến bao gồm polypeptit có các đoạn thay thế bảo toàn của các gốc axit amin, một hoặc nhiều cải biến làm khuyết hoặc thêm axit amin mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính chức năng, hoặc sử dụng các chất tương tự hóa học. Gốc axit amin có thể được thay thế theo cách bảo toàn cho một gốc axit amin khác bao gồm nhưng không giới hạn ở: glyxin/alanin; serin/threonin; valin/isoleuxin/leuxin; asparagin/glutamin; axit aspartic/axit glutamic; lysin/arginin; và phenylalanin/tyrosin. Các polypeptit này còn bao gồm polypeptit được glycosyl hóa và không được glycosyl hóa, cũng như polypeptit với các cải biến sau dịch mã khác, như, ví dụ, glycosyl hóa với các đường khác nhau, axetyl hóa, và phosphoryl hóa. Tốt hơn là, các đoạn thay thế axit amin nên bảo toàn, nghĩa là, axit amin được thay thế sẽ có các tính chất hóa học tương tự như tính chất của axit amin gốc. Các đoạn thay thế bảo toàn như vậy là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các ví dụ được nêu ở trên. Các cải biến của axit amin có thể trong phạm vi từ thay đổi hoặc cải biến một hoặc nhiều axit amin đến thiết kế lại hoàn toàn một vùng, như miền biến đổi. Các thay đổi trong miền biến đổi có thể làm thay đổi ái lực và/hoặc tính đặc hiệu liên kết. Các phương pháp cải biến khác bao gồm sử dụng kỹ thuật liên hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương tiện enzym hóa, thay thế oxy hóa và chelat hóa. Các phương pháp cải biến có thể được sử dụng, ví dụ, để gắn các chất đánh dấu cho thử nghiệm miễn dịch, như gắn các gốc có hoạt tính phóng xạ cho thử nghiệm phóng xạ miễn dịch. Polypeptit đã cải biến được tạo ra bằng cách sử dụng các quy trình được thiết lập trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng các thử nghiệm tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế bao gồm protein dung hợp chứa một hoặc nhiều polypeptit hoặc các kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 theo sáng chế này. Theo một phương án, polypeptit dung hợp được tạo ra chứa chuỗi nhẹ, chuỗi nặng hoặc cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Theo một phương án khác, polypeptit dung hợp chứa vùng hằng định globulin miễn dịch khác loại. Theo một phương án khác, polypeptit dung hợp chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra từ kỹ thuật lai được lưu giữ công khai. Đối với các mục đích của sáng chế, protein dung hợp của kháng

thể chứa một hoặc nhiều miền polypeptit mà liên kết đặc hiệu với LAG-3 và một trình tự axit amin khác mà không được gắn trong phân tử tự nhiên, ví dụ, trình tự khác loại hoặc trình tự cùng loại từ một vùng khác.

X. Sử dụng phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế

Sáng chế bao gồm các chế phẩm, bao gồm dược phẩm, chứa phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng LAG-3, kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép kháng LAG-3, *v.v.)*, polypeptit có nguồn gốc từ các phân tử này, polynucleotit chứa các trình tự mã hóa các phân tử hoặc polypeptit này, và các tác nhân khác như được mô tả ở đây.

Như được nêu ở trên, LAG-3 đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa âm sự tăng sinh, chức năng và nội cân bằng tế bào T. Phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có khả năng ức chế chức năng LAG-3, và do đó đảo ngược sự ức chế hệ thống miễn dịch qua trung gian LAG-3. Như vậy, LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, và LAG-3 mAb 6, các dẫn xuất được làm giống như của người của chúng, và các phân tử chứa các mảnh liên kết LAG-3 của chúng (ví dụ, các kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép, *v.v.)*, hoặc cạnh tranh để liên kết với các kháng thể này, có thể được sử dụng để phong bế sự ức chế hệ miễn dịch qua trung gian LAG-3, và nhờ đó thúc đẩy sự hoạt hóa của hệ miễn dịch.

Phân tử liên kết LAG-3 đặc hiệu kép theo sáng chế liên kết với LAG-3 và một phân tử khác liên quan đến việc điều hòa điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt tế bào (ví dụ, PD-1) làm gia tăng hệ miễn dịch bằng cách ngăn chặn sự ức chế hệ miễn dịch được điều tiết bởi LAG-3 và các phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này. Vì vậy, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế hữu ích để làm gia tăng đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T) của đối tượng. Cụ thể, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế và có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ liên quan đến hệ miễn dịch bị ức chế theo hướng không mong muốn, bao gồm bệnh ung thư và các bệnh liên quan đến sự có mặt của nguồn gây bệnh (ví dụ, sự lây nhiễm vi khuẩn, nấm, virut hoặc động vật nguyên sinh protozoan).

Các bệnh ung thư có thể được điều trị bằng phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm các bệnh ung thư được đặc trưng bởi sự có mặt của tế bào ung thư được chọn từ nhóm bao gồm tế bào của: u tuyến thượng thận, bệnh ung thư liên quan đến AIDS, sacôm nang mô mềm, u tế bào hình sao, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tủy sống, u não di căn, bệnh ung thư vú, u thể cảnh, bệnh ung thư cổ, sacôm sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào sáng, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư đại trực tràng, u mô bào sợi trên da lành tính, u tế bào nhỏ tròn tạo mô xơ, u màng não thất, khối u Ewing, sacôm sụn dạng niêm dịch ngoài khung xương, bệnh xương dễ gãy tạo sụn, bệnh loạn sản xơ xương, bệnh ung thư túi mật hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh nguyên bào nuôi thai kỳ, u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư tế bào tiểu đảo, sacôm Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, u mỡ/khối u mỡ lành tính, sacôm mỡ/khối u mỡ ác tính, bệnh ung thư gan, u lympho, bệnh ung thư phổi, u nguyên tủy bào, u hắc sắc tố, u màng não, đa u tuyến nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, u tuyến cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, u vỏ thần kinh ngoại vi, u tủy thượng thận, u tuyến yên, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u hắc sắc tố sau màng mạch nho, rối loạn máu hiếm, bệnh ung thư thận di căn, khối u hình gậy, sacôm cơ vân, sacôm, bệnh ung thư da, sacôm mô mềm, bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư dạ dày, sacôm hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, bệnh ung thư di căn tuyến giáp, và bệnh ung thư tử cung.

Cụ thể, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom tế bào gan, u thần kinh đệm, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư vú, đa u tủy, bệnh ung thư bàng quang, u nguyên bào thần kinh; sacôm, u lympho không phải Hodgkin, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy và bệnh ung thư đại tràng.

Bệnh liên quan đến nguồn gây bệnh có thể được điều trị bằng phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm bệnh nhiễm virut, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng mạn tính. Các bệnh lây nhiễm mạn tính có thể được điều trị bằng phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm virut Epstein Barr, virut viêm gan A (HAV); virut

viêm gan B (HBV); virut viêm gan C (HCV); virut herpes (ví dụ, HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), virut suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virut viêm miệng mụn nước (VSV), *Bacilli, Citrobacter, Cholera, Diphtheria, Enterobacter, Gonococci, Helicobacter pylori, Klebsiella, Legionella, Meningococci, mycobacteria, Pseudomonas, Pneumonococci,* vi khuẩn rickettsia, *Salmonella, Serratia, Staphylococci, Streptococci, Tetanus, Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *v.v.)*, *Blastomyces dermatitidis, Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *v.v.)*, *Cryptococcus neoformans,* Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis, Borrelia burgdorferi*, giun sán (giun móc, sán dây, sán lá, sán dẹp (ví dụ, *Schistosomia*), *Giardia lambia*, *trichinella*, *Dientamoeba Fragilis*, *Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi,* và *Leishmania donovani*.

Phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể được kết hợp với chất sinh miễn dịch như vắc xin khối u. Các vắc xin này có thể chứa kháng nguyên khối u đã tinh chế (bao gồm protein tái tổ hợp, peptit, và các phân tử hydrat cacbon), các tế bào khối u tự rụng hoặc dị sinh. Một số chiến lược vắc xin khối u đã được mô tả (xem ví dụ, Palena, C., *et al.*, (2006) "*Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies*", Adv. Cancer Res. 95, 115-145; Mellman, I., *et al.* (2011) "*Cancer immunotherapy comes of age*", Nature 480, 480–489; Zhang, X. M. *et al.* (2008) "*The Anti-Tumor Immune Response Induced By A Combination of MAGE-3/MAGE-n-Derived Peptides*", Oncol. Rep. 20, 245–252; Disis, M. L. *et al.* (2002) "*Generation of T-cell Immunity to the HER-2/neu Protein After Active Immunization with HER-2/neu Peptide-Based Vaccines*", J. Clin. Oncol. 20:2624-2632; Vermeij, R. *et al.* (2012) "*Potentiation of a p53-SLP Vaccine By Cyclophosphamide In Ovarian Cancer: A Single-Arm Phase II Study*". Int. J. Cancer 131:E670-E680). Phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể được kết hợp với phác đồ hóa trị. Trong các trường hợp này, có thể có khả năng giảm liều lượng chất phản ứng hóa trị được dùng (Mokyr. M.B. *et al.* (1998) "*Realization Of The Therapeutic Potential Of CTLA-4 Blockade In Low-Dose Chemotherapy-Treated Tumor-Bearing Mice*", Cancer Research 58: 5301-5304).

Phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể được kết hợp với các phân tử kích thích miễn dịch khác như các kháng thể hoạt hóa tính đáp ứng miễn dịch ở vật chủ để tạo ra mức độ hoạt hóa tế bào T tăng lên. Cụ thể, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1 và/hoặc kháng thể kháng CTLA-4 đã được chứng minh là hoạt hóa hệ miễn dịch (xem, ví dụ, del Rio, M-L. *et al.* (2005) "*Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation*", Eur. J. Immunol 35:3545-3560; Barber, D. L. *et al.* (2006) "*Restoring Function In Exhausted CD8 T Cells During Chronic Viral Infection*", Nature 439, 682–687; Iwai, Y. *et al.* (2002) "*Involvement of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune Systen And Tumor Immunotherapy by PD-L1 blockade*", Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12293–12297; Leach, D. R., *et al.*, (1996) "*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*", Science 271, 1734-1736). Các phân tử kích thích miễn dịch khác mà có thể được kết hợp với phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế bao gồm các kháng thể đối với các phân tử trên bề mặt của tế bào đuôi gai mà hoạt hóa chức năng tế bào đuôi gai (DC) và sự trình diện kháng nguyên, kháng thể kháng CD40 có thể thay thế cho hoạt tính trợ giúp của tế bào T, và hoạt hóa các kháng thể đối với các phân tử đồng kích thích tế bào T như PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB, và ICOS (xem, ví dụ, Ito *et al.* (2000) "*Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies*",Immunobiology 201:527-40; Patent Mỹ số 5811097; Weinberg *et al.* (2000) "*Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity*", Immunol 164:2160-2169; Melero *et al.* (1997) "*Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors*", Nature Medicine 3: 682-685; Hutloff *et al.* (1999) "*ICOS is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related to CD28*", Nature 397: 263-266; và Moran, A.E. *et al.* (2013) "*The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy*", Curr Opin Immunol. 2013 Apr; 25(2): 10.1016/j.coi.2013.01.004), và/hoặc thụ thể của kháng nguyên khảm kích thích (CAR) chứa miền liên kết kháng nguyên được định hướng chống lại kháng nguyên gây bệnh đã dung hợp với một hoặc nhiều miền truyền tín hiệu nội bào từ các thụ thể protein đồng kích thích khác nhau (ví dụ, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, *v.v.)* mà

nhằm để kích thích tế bào T khi liên kết kháng nguyên (xem, ví dụ, Tettamanti, S. *et al.* (2013) "*Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric* Antigen *Receptor*", Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. *et al.* (2014) "*Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells*", Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. *et al.* (2013) "*T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia*", Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. *et al.* (2014) "*Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo*", Leukemia 28(8):1596-1605).

Phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể được kết hợp với thụ thể của kháng nguyên khảm ức chế (iCAR) để làm lệch hướng các đáp ứng trị liệu miễn dịch sai đích. Miền liên kết kháng nguyên iCAR được định hướng chống lại kháng nguyên gây bệnh đã dung hợp với một hoặc nhiều miền truyền tín hiệu nội bào từ các thụ thể protein ức chế khác nhau (ví dụ, CTLA-4, PD-1, *v.v.)* mà nhằm để kìm hãm đáp ứng tế bào T khi liên kết kháng nguyên (xem, ví dụ, Fedorov V.D. (2013) "*PD-1– and CTLA-4–Based Inhibtory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses*", Sci Tranl Med. 5(215):215ra172).

Cụ thể, các kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng CD137, kháng thể kháng OX40, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1, kháng thể kháng TIGIT, kháng thể kháng TIM-3 và/hoặc vắc xin ung thư.

Ngoài việc sử dụng chúng trong liệu pháp trị liệu, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể được đánh dấu phát hiện được và sử dụng để tìm ra LAG-3 trong mẫu hoặc tạo ảnh LAG-3 trên các tế bào.

XI. Dược phẩm

Chế phẩm theo sáng chế bao gồm chế phẩm thuốc đóng khối hữu ích để sản xuất dược phẩm (ví dụ, chế phẩm không tinh khiết hoặc không vô trùng) và dược phẩm (nghĩa là, chế phẩm thích hợp để dùng cho đối tượng hoặc bệnh nhân) mà có thể được sử dụng trong dạng bào chế của các dạng liều đơn vị. Các chế phẩm này chứa lượng có tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa bệnh của phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế, hoặc tổ hợp của các chất như vậy và chất mang dược dụng. Tốt hơn là, chế phẩm theo sáng chế chứa lượng có tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa bệnh của phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế và chất mang dược dụng. Cụ thể, sáng chế bao gồm dược phẩm như vậy, trong đó phân tử liên kết LAG-3 là: kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6; kháng thể LAG-3 mAb 1; LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4 LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 được làm giống như của người; mảnh liên kết LAG-3 của kháng thể bất kỳ như vậy; hoặc trong đó phân tử liên kết LAG-3 là kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép LAG-3 (ví dụ, kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép LAG-3 x PD-1). Đặc biệt được bao gồm là các phân tử như vậy mà chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 1; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 2; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 3, hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 4, hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 5, hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 6.

Sáng chế còn bao gồm dược phẩm như vậy mà còn chứa kháng thể trị liệu thứ hai (ví dụ, kháng thể đơn dòng đặc hiệu khối u) mà đặc hiệu đối với kháng nguyên ung thư cụ thể, và chất mang dược dụng.

Theo một phương án cụ thể, thuật ngữ "dược dụng" có nghĩa là được chấp nhận bởi cơ quan điều hành của Liên bang hoặc chính phủ tiểu bang hoặc được liệt kê trong dược điển Mỹ hoặc dược điển thường được biết khác để sử dụng cho động vật, và đặc biệt hơn là người. Thuật ngữ "chất mang" dùng để chỉ chất pha loãng, chất bổ trợ (ví dụ, chất bổ trợ Freund (hoàn thiện và không hoàn thiện), tá dược, hoặc chất dẫn thuốc mà chất trị liệu được sử dụng cùng. Chất mang dược như vậy có thể là chất lỏng vô trùng, như nước và dầu, bao gồm các chất có nguồn gốc từ dầu mỏ,

động vật, thực vật hoặc tổng hợp, như dầu đậu phộng, dầu đậu nành, dầu khoáng, dầu vừng và các loại dầu tương tự. Nước là chất mang được ưu tiên khi dược phẩm được sử dụng trong tĩnh mạch. Dung dịch nước muối và dung dịch dextroza và glyxerol chứa nước cũng có thể được sử dụng dưới dạng chất mang lỏng, đặc biệt đối với dung dịch tiêm. Các tá dược dược lý thích hợp bao gồm tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mì, đá phấn, silicagel, natri stearat, glyxerol monostearat, đá talc, natri clorua, sữa tách béo dạng khô, glyxerol, propylen, glycol, nước, etanol và tá dược tương tự. Dược phẩm, nếu muốn, cũng có thể chứa các lượng nhỏ của chất thấm ướt hoặc chất nhũ hóa, hoặc chất đệm pH. Các dược phẩm này có thể có dạng dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, bột, chế phẩm giải phóng chậm và các dạng tương tự.

Nhìn chung, các thành phần của dược phẩm theo sáng chế được cung cấp riêng rẽ hoặc được trộn cùng nhau ở dạng liều đơn vị, ví dụ, dưới dạng bột được làm khô lạnh hoặc nước cô tự do trong vật chứa kín khí như ampun hoặc gói nhỏ chỉ báo lượng hoạt chất này. Khi dược phẩm được dùng bằng cách truyền, nó có thể được phân tán với chai truyền chứa nước hoặc nước muối bậc dược vô trùng. Khi dược phẩm được sử dụng bằng cách tiêm, thì ampun chứa nước vô trùng dùng để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi dùng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phối trộn dưới dạng trung hòa hoặc dạng muối. Muối dược dụng gồm, nhưng không giới hạn ở các muối được tạo ra với anion như các muối có nguồn gốc từ axit clohydric, axit phosphoric, axit axetic, axit oxalic, axit tartric, *v.v.*, và các muối được tạo ra với cation như các muối có nguồn gốc từ natri, kali, amoni, canxi, hydroxit sắt, isopropylamin, trietylamin, 2-etylamino etanol, histidin, procain, *v.v.*.

Sáng chế còn đề cập đến gói hoặc kit dược phẩm chứa một hoặc nhiều vật chứa được làm đầy phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế (và tốt hơn nữa là, kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6; kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 được làm giống như của người; mảnh

liên kết LAG-3 của kháng thể như vậy bất kỳ; hoặc trong đó phân tử liên kết LAG-3 là kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép LAG-3 (ví dụ, kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép LAG-3 x PD-1)). Đặc biệt được bao gồm các phân tử như vậy mà chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 1; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 2; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 3; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 4; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 5; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 6, một mình hoặc với chất mang dược dụng như vậy. Ngoài ra, một hoặc nhiều chất điều trị hoặc phòng ngừa khác hữu ích để điều trị bệnh cũng có thể được bao gồm trong gói hoặc kit dược phẩm này. Sáng chế còn đề cập đến gói hoặc kit dược phẩm chứa một hoặc nhiều vật chứa được làm đầy một hoặc nhiều thành phần của dược phẩm theo sáng chế. Có thể tùy ý kết hợp (các) vật chứa này cùng với lưu ý ở dạng được quy định bởi cơ quan chính phủ quản lý việc sản xuất, sử dụng hoặc bán dược phẩm hoặc sản phẩm sinh học, lưu ý này phản ánh sự phê chuẩn của cơ quan sản xuất, sử dụng hoặc bán để dùng cho người.

Sáng chế đề cập đến kit có thể được sử dụng trong các phương pháp ở nêu. Kit này có thể chứa phân tử liên kết LAG-3 bất kỳ theo sáng chế. Kit này còn có thể chứa một hoặc nhiều chất phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh khác hữu ích để điều trị bệnh ung thư, trong một hoặc nhiều vật chứa; và/hoặc kit này còn có thể chứa một hoặc nhiều kháng thể gây độc tế bào mà liên kết một hoặc nhiều kháng nguyên ung thư liên quan đến bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, chất điều trị hoặc phòng ngừa bệnh khác là chất hóa trị. Theo các phương án khác, chất điều trị hoặc phòng ngừa bệnh là chất trị liệu sinh học hoặc hormon.

XII. Phương pháp sử dụng

Chế phẩm theo sáng chế có thể được đề xuất để điều trị, phòng ngừa, và cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc lây nhiễm bằng cách cho đối tượng đó dùng lượng có tác dụng của protein dung hợp hoặc phân tử được liên hợp theo sáng chế, hoặc dược phẩm chứa protein dung hợp hoặc phân tử được liên hợp theo sáng chế. Theo một khía cạnh được ưu tiên, chế phẩm này gần như tinh khiết (nghĩa là, gần như không có các chất làm hạn chế tác dụng của nó hoặc gây ra tác dụng phụ không mong muốn). Theo một phương án cụ thể, đối tượng

này là động vật, tốt hơn là động vật có vú như động vật không phải động vật linh trưởng (ví dụ, bò, ngựa, mèo, chó, chuột, *v.v.)* hoặc động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ như, khỉ đầu chó, người, *v.v.)*. Theo một phương án được ưu tiên, đối tượng nêu trên là người.

Các hệ thống phân phối khác nhau là đã biết và có thể được sử dụng để dùng chế phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao nang trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện kháng thể hoặc protein dung hợp, nhập bào qua trung gian thụ thể (Xem, ví dụ, Wu *et al.* (1987) *"Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System"*, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), xây dựng cấu trúc của axit nucleic như là một phần của retrovirut hoặc vectơ khác, *v.v.*.

Phương pháp sử dụng phân tử theo sáng chế gồm, nhưng không giới hạn ở, đường dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), gây tê ngoài màng cứng, và trong niêm mạc (ví dụ, đường trong mũi và qua đường miệng). Theo một phương án cụ thể, phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế được dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, hoặc dưới da. Chế phẩm có thể được dùng bằng đường thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm liều lớn, bằng cách hấp thụ qua lớp biểu mô hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, trực tràng và niêm mạc ruột, *v.v.)* và có thể được sử dụng cùng với các chất có hoạt tính sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc khu trú. Ngoài ra, việc sử dụng trong phổi cũng có thể được sử dụng, ví dụ, bằng cách sử dụng thiết bị xông hít hoặc ống phun, và phối trộn với chất tạo khí dung. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6019968; 5985 320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540; và 4880078; và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; và WO 99/66903, mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế được đóng gói trong vật chứa kín khí như ampun hoặc gói nhỏ chỉ định lượng phân tử đó. Theo một phương án, các phân tử như vậy được cung cấp dưới dạng bột được làm khô lạnh vô trùng hoặc nước cô tự do trong vật chứa kín khí và có thể được hoàn nguyên, ví dụ, với nước hoặc nước muối đến nồng độ thích hợp để dùng cho đối tượng. Tốt hơn là,

phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế được cung cấp dưới dạng bột được làm khô lạnh vô trùng trong vật chứa kín khí.

Phân tử liên kết LAG-3 đã được làm khô lạnh theo sáng chế nên được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong vật chứa ban đầu của chúng và các phân tử này nên được dùng trong vòng 12 giờ, tốt hơn là trong vòng 6 giờ, trong vòng 5 giờ, trong vòng 3 giờ, hoặc trong vòng 1 giờ sau khi được hoàn nguyên. Theo một phương án thay thế, các phân tử như vậy được cung cấp ở dạng lỏng trong vật chứa kín khí chỉ định lượng và nồng độ của phân tử, protein dung hợp, hoặc phân tử được liên hợp. Tốt hơn là, các phân tử liên kết LAG-3 như vậy khi được tạo ra ở dạng lỏng được cung cấp trong vật chứa kín khí.

Lượng chế phẩm theo sáng chế mà sẽ có tác dụng trong điều trị, ngăn ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Liều lượng chính xác cần được sử dụng trong chế phẩm cũng phụ thuộc vào đường dùng, và độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý, và nên được quyết định theo đánh giá của bác sĩ và từng trường hợp bệnh nhân. Liều lượng có tác dụng có thể được ngoại suy từ đường cong đáp ứng liều lượng thu được từ hệ thống thử nghiệm ở mô hình động vật hoặc *in vitro*.

Như được sử dụng ở đây, "lượng có tác dụng" của dược phẩm, theo một phương án, là lượng đủ để có tác dụng có lợi hoặc kết quả mong muốn gồm, nhưng không giới hạn ở, các kết quả lâm sàng như làm giảm các triệu chứng do bệnh gây ra, làm suy yếu triệu chứng của bệnh lây nhiễm (ví dụ, tải lượng virut, sốt, đau, nhiễm trùng, *v.v.)* hoặc triệu chứng của bệnh ung thư (ví dụ, sự tăng sinh, của tế bào ung thư, sự xuất hiện khối u, di căn khối u, *v.v.)*, nhờ đó làm tăng chất lượng cuộc sống của các đối tượng mắc bệnh, làm giảm liều lượng các thuốc khác cần để điều trị bệnh, tăng cường tác dụng của một thuốc khác như thông qua việc hướng đích và/hoặc tiếp nhận, làm chậm sự tiến triển của bệnh, và/hoặc kéo dài sự sống cho các cá thể.

Lượng có tác dụng có thể được dùng trong một hoặc nhiều lần dùng. Đối với các mục đích của sáng chế, lượng có tác dụng của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm là lượng đủ để làm giảm sự tăng sinh (hoặc tác dụng của) của sự có mặt virut và làm

giảm và/hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh virut, một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo một số phương án, lượng có tác dụng của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm có thể đạt được hoặc có thể không đạt được khi kết hợp với một thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm khác. Vì vậy, "lượng có tác dụng" có thể được xem xét trong ngữ cảnh sử dụng một hoặc nhiều chất hóa trị, và chất đơn lẻ có thể được xem xét để đưa vào ở lượng có tác dụng nếu, khi kết hợp với một hoặc nhiều chất khác, thì có thể đạt được hoặc sẽ đạt được kết quả mong muốn. Trong khi nhu cầu của từng cá thể thay đổi, việc xác định các khoảng tối ưu của lượng có tác dụng của mỗi thành phần là nằm trong phạm vi kiến thức của lĩnh vực kỹ thuật này.

Đối với phân tử liên kết LAG-3 nằm trong phạm vi của sáng chế (ví dụ, các kháng thể, các kháng tổ hợp kép, *v.v.)*, liều lượng được dùng cho bệnh nhân tốt hơn là được xác định dựa trên trọng lượng cơ thể (kg) của đối tượng tiếp nhận. Đối với phân tử liên kết LAG nằm trong phạm vi của sáng chế, liều lượng được dùng cho bệnh nhân thường là từ ít nhất khoảng 0,01μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 0,05μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 0,1μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 0,2μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 0,5μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 1μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 2μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 3μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 5μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 10μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 20μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 30μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 50μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 100μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 250μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 750μg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 1,5mg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 3mg/kg trọng lượng cơ thể, ít nhất khoảng 5mg/kg trọng lượng cơ thể, hoặc ít nhất khoảng 10mg/kg, ít nhất khoảng 30mg/kg, ít nhất khoảng 50mg/kg, ít nhất khoảng 75mg/kg, ít nhất khoảng 100mg/kg, ít nhất khoảng 125mg/kg, ít nhất khoảng 150mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc cao hơn. Liều lượng đã tính toán được dùng dựa trên trọng lượng cơ thể của bệnh nhân ở mức cơ sở. Sự thay đổi đáng kể (≥ 10%) ở trọng lượng cơ thể so với mức cơ sở hoặc trọng lượng ổn định đã được thiết lập nên thúc đẩy việc tính toán lại liều lượng.

Theo một số phương án, phân tử liên kết LAG-3 đặc hiệu kép (ví dụ, kháng tổ hợp kép và phân tử liên kết ba giá) nằm trong phạm vi của sáng chế, liều lượng được

dùng cho bệnh nhân thường nằm trong khoảng từ ít nhất khoảng 0,3ng/kg mỗi ngày đến khoảng 0,9ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 1ng/kg mỗi ngày đến khoảng 3ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 3ng/kg mỗi ngày đến khoảng 9ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 10ng/kg mỗi ngày đến khoảng 30ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 30ng/kg mỗi ngày đến khoảng 90ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 100ng/kg mỗi ngày đến khoảng 300ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 200ng/kg mỗi ngày đến khoảng 600ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 300ng/kg mỗi ngày đến khoảng 900ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 400ng/kg mỗi ngày đến khoảng 800ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 500ng/kg mỗi ngày đến khoảng 1000ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 600ng/kg mỗi ngày đến khoảng 1000ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 700ng/kg mỗi ngày đến khoảng 1000ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 800ng/kg mỗi ngày đến khoảng 1000ng/kg mỗi ngày, từ ít nhất khoảng 900ng/kg mỗi ngày đến khoảng 1000ng/kg mỗi ngày, hoặc ít nhất khoảng 1000ng/kg mỗi ngày. Liều lượng được tính toán được dùng dựa trên trọng lượng cơ thể của bệnh nhân ở mức cơ sở. Thay đổi đáng kể (≥ 10%) ở trọng lượng cơ thể so với mức cơ sở hoặc trọng lượng ổn định được thiết lập thì nên cân nhắc tính toán lại liều lượng.

Theo một phương án khác, bệnh nhân được cho sử dụng chế độ điều trị bao gồm một hoặc nhiều liều của lượng có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh như vậy của phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế, trong đó chế độ điều trị này được sử dụng trong 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày hoặc 7 ngày. Theo các phương án nhất định, chế độ điều trị này bao gồm các liều lượng dùng ngắt quãng của lượng có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh của phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế (ví dụ, dùng một liều vào ngày 1, ngày 2, ngày 3 và ngày 4 của tuần đó và không dùng các liều lượng của lượng có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh của phân tử liên kết LAG-3 (và cụ thể là, kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, LAG-3 mAb 6; kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, hoặc LAG-3 mAb 6 được làm giống như của người; mảnh liên kết LAG-3 của kháng thể bất kỳ như vậy; hoặc trong đó phân tử liên kết LAG-3 này là kháng tổ hợp kép đặc hiệu kép LAG-3 (ví dụ, kháng tổ hợp kép Fc đặc hiệu kép LAG-3 x PD-1). Đặc biệt được bao gồm là việc sử dụng (vào ngày 5, ngày 6 và ngày 7 của cùng tuần đó) các phân tử chứa 3

$CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 1; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 2; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 3; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 4; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 5; hoặc chứa 3 $CDR_L$ và 3 $CDR_H$ của LAG-3 mAb 6. Thông thường, có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều hơn 5 chu trình điều trị. Mỗi chu trình có thể là cùng một chế độ hoặc một chế độ khác.

Theo một phương án khác, liều lượng được dùng tăng lên so với phần tư thứ nhất, phần hai thứ nhất hoặc hai phần ba thứ nhất hoặc ba phần tư của (các) chế độ (ví dụ, so với chế độ thứ nhất, thứ hai, hoặc thứ ba của việc điều trị gồm 4 chu trình) cho đến khi đạt được lượng có tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hằng ngày của phân tử liên kết LAG-3. Bảng 6 nêu 5 ví dụ về các chế độ định liều khác nhau được mô tả ở trên đối với chu trình điều trị điển hình bằng kháng tổ hợp kép.

Bảng 6

| Chế độ | Ngày | Liều lượng của kháng tổ hợp kép (ng kháng tổ hợp kép trên mỗi kg trọng lượng của đối tượng mỗi ngày) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1, 2, 3, 4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 5, 6, 7 | không | không | không | không | không |
| 2 | 1, 2, 3, 4 | 300 | 500 | 700 | 900 | 1000 |
| | 5, 6, 7 | không | không | không | không | không |
| 3 | 1, 2, 3, 4 | 300 | 500 | 700 | 900 | 1000 |
| | 5, 6, 7 | không | không | không | không | không |
| 4 | 1, 2, 3, 4 | 300 | 500 | 700 | 900 | 1000 |
| | 5, 6, 7 | không | không | không | không | không |

Liều lượng và tần suất sử dụng của phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể được làm giảm hoặc thay đổi bằng cách tăng cường sự hấp thụ và sự thẩm thấu vào mô của phân tử bằng các phương pháp cải biến như, ví dụ, lipit hóa.

Liều lượng của phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân có thể được tính toán để sử dụng dưới dạng liệu pháp duy nhất một chất. Theo cách khác, phân tử này có thể được sử dụng kết hợp với các chế phẩm trị liệu khác và liều lượng được dùng cho bệnh nhân là thấp hơn so với khi các phân tử này được sử dụng dưới dạng liệu pháp duy nhất một chất.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng khu trú trên vùng cần điều trị; điều này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, và không nhằm giới hạn ở, truyền tại chỗ, bằng cách tiêm, hoặc bằng cách cấy ghép, mảnh ghép này làm từ vật liệu xốp, không xốp, hoặc sền sệt, bao gồm các màng, như màng sialastic, hoặc sợi. Tốt hơn là, khi sử dụng phân tử theo sáng chế, phải cẩn trọng khi sử dụng các vật liệu mà phân tử không hấp thụ vào.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối trong nang, cụ thể là liposom (Xem Langer (1990) *"New Methods Of Drug Delivery",* Science 249:1527-1533); Treat *et al.*, in LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327).

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối trong hệ thống giải phóng có kiểm soát hoặc hệ thống giải phóng chậm. Kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để sản xuất chế phẩm giải phóng chậm chứa một hoặc nhiều phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 4526938; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 91/05548; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel",* Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions",* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application",* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; và Lam *et al.* (1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery",* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng trong hệ thống giải phóng có kiểm soát (Xem Langer, nêu trên; Sefton, (1987) *"Implantable Pumps",* CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald *et al.* (1980) *"Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis",* Surgery 88:507-516; và Saudek *et al.* (1989) *"A Preliminary Trial Of*

*The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery",* N. Engl. J. Med. 321:574-579). Theo một phương án khác, vật liệu polyme có thể được sử dụng để có được sự giải phóng có kiểm soát của các phân tử (xem ví dụ, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy *et al.* (1985) *"Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate",* Science 228:190-192; During *et al.* (1989) *"Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization",* Ann. Neurol. 25:351-356; Howard *et al.* (1989) *"Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits",* J. Neurosurg. 7(1):105-112); patent Mỹ số 5679377; patent Mỹ số 5916597; patent Mỹ số 5912015; patent Mỹ số 5989463; patent Mỹ số 5128326; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 99/15154; và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 99/20253). Các ví dụ về polyme được sử dụng trong chế phẩm giải phóng chậm gồm, nhưng không giới hạn ở, poly(2-hydroxy etyl metacrylat), poly(metyl metacrylat), poly(axit acrylic), poly(etylen-co-vinyl axetat), poly(axit metacrylic), polyglycolit (PLG), polyanhydrit, poly(N-vinyl pyrolidon), poly(rượu vinylic), polyacrylamit, poly(etylen glycol), polylactit (PLA), poly(lactit-co-glycolit) (PLGA), và polyorthoeste. Hệ thống giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở vị trí gần với đích trị liệu (ví dụ, phổi), do đó chỉ yêu cầu một phần của liều toàn thân (xem, ví dụ, Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, nêu trên, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Chế phẩm dạng polyme hữu ích để làm mảnh ghép giải phóng có kiểm soát có thể được sử dụng theo Dunn *et al.* (Xem Patent Mỹ số 5945155). Phương pháp đặc biệt này là dựa trên tác dụng trị liệu khi giải phóng có kiểm soát *in situ* vật liệu có hoạt tính sinh học từ hệ polyme. Việc cấy ghép thường có thể diễn ra ở bất kỳ đâu trong cơ thể của bệnh nhân cần điều trị trị liệu. Hệ thống phân phối duy trì không phải polyme có thể được sử dụng, nhờ đó mảnh ghép không phải polyme trong cơ thể của đối tượng được sử dụng dưới dạng hệ thống phân phối thuốc. Khi cấy ghép trong cơ thể, dung môi hữu cơ của mảnh ghép sẽ tản ra, phân tán, hoặc chiết từ chế phẩm vào dịch mô xung quanh, và vật liệu không phải polyme

này sẽ đông tụ hoặc kết tủa dần dần để tạo ra cơ chất rắn, vi xốp (Xem patent Mỹ số 5888533).

Hệ thống giải phóng có kiểm soát được mô tả trong tài liệu của Langer (1990, *"New Methods Of Drug Delivery",* Science 249:1527-1533). Kỹ thuật bất kỳ đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để sản xuất chế phẩm giải phóng chậm chứa một hoặc nhiều chất trị liệu theo sáng chế. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4526938; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 91/05548 và WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel",* Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions",* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application",* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; và Lam *et al.* (1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery",* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Khi chế phẩm theo sáng chế là axit nucleic mã hóa phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế, axit nucleic này có thể được sử dụng *in vivo* để thúc đẩy sự biểu hiện của phân tử liên kết LAG-3 được mã hóa của nó bằng cách xây dựng cấu trúc cho nó như là một phần của vectơ biểu hiện axit nucleic thích hợp và sử dụng nó sao cho nó trở thành nội bào, ví dụ, bằng cách sử dụng vectơ retrovirut (Xem Patent Mỹ số 4980286), hoặc bằng cách tiêm trực tiếp, hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật bắn phá vi hạt (ví dụ, súng bắn gen; Biolistic, Dupont), hoặc phủ lipit hoặc thụ thể bề mặt tế bào hoặc chất chuyển gen, hoặc bằng cách sử dụng nó trong mối liên kết với peptit giống homeobox mà đã biết là đi vào các nhân (Xem ví dụ, Joliot *et al.* (1991) *"Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis",* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), *v.v.*. Theo cách khác, axit nucleic có thể được đưa vào nội bào và được kết hợp trong ADN của tế bào chủ để biểu hiện bằng cách tái tổ hợp đồng nhất.

Việc điều trị cho đối tượng với lượng có tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa bệnh của phân tử liên kết LAG-3 theo sáng chế có thể bao gồm một lần điều trị hoặc, tốt hơn là, có thể bao gồm nhiều lần điều trị. Trong một ví dụ được ưu tiên, đối tượng được điều trị bằng kháng tổ hợp kép này một lần một tuần trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 10 tuần, tốt hơn là từ 2 đến 8 tuần, tốt hơn nữa là từ khoảng 3 đến 7 tuần, và thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 4, 5, hoặc 6 tuần. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng một lần một ngày, hai lần một ngày, hoặc ba lần một ngày. Theo cách khác, dược phẩm này có thể được dùng một lần một tuần, hai lần một tuần, một lần mỗi hai tuần, một lần mỗi tháng, một lần mỗi sáu tuần, một lần mỗi hai tháng, hai lần một năm hoặc một lần mỗi năm. Cũng cần hiểu rằng rằng liều lượng có tác dụng của các phân tử được sử dụng để điều trị có thể tăng lên hoặc giảm đi so với chu trình điều trị cụ thể.

**Ví dụ thực hiện sáng chế**

Sáng chế đã được mô tả tổng quát và sẽ được hiểu dễ dàng hơn bằng cách tham khảo các ví dụ dưới đây, được nêu ra chỉ nhằm minh họa và không được dự định là làm giới hạn sáng chế trừ khi được nêu cụ thể. Điều này sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng nhiều cải biến, cả đối với vật liệu và phương pháp, có thể được thực hiện mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Mô tả đặc điểm của kháng thể đơn dòng LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, và LAG-3 mAb 6 kháng LAG-3

Sáu kháng thể đơn dòng của chuột được phân lập dưới dạng có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với cả LAG-3 của người và khỉ đầu chó, và tuân theo các ký hiệu "LAG-3 mAb 1", "LAG-3 mAb 2", "LAG-3 mAb 3", "LAG-3 mAb 4", "LAG-3 mAb 5", và "LAG-3 mAb 6". Các CDR của các kháng thể này được phát hiện ra là khác nhau và được nêu ở trên. LAG-3 mAb 1 được làm giống như của người thu được hai miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu trong bản mô tả là "hLAG-3 mAb 1 VH-1", và "hLAG-3 mAb 1 VH-2", và bốn miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả là "hLAG-3 mAb 1 VL-1", "hLAG-3 mAb 1 VL-2", "hLAG-3 mAb 1 VL-3", và "hLAG-3 mAb 1 VL-4". LAG-3 mAb 6 cũng được làm giống như của người thu được hai miền VH được làm giống

như của người, được ký hiệu trong bản mô tả là "hLAG-3 mAb 6 VH-1", và "hLAG-3 mAb 6 VH-2", và hai miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả là "hLAG-3 mAb 6 VL-1", và "hLAG-3 mAb 6 VL-2". Như được đề cập ở trên, các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm giống như của người của kháng thể đã nêu có thể được sử dụng trong tổ hợp bất kỳ và các tổ hợp cụ thể của các miền biến đổi được làm giống như của người được đề cập đến bằng cách tham khảo miền VH/VL cụ thể, ví dụ, kháng thể được làm giống như của người chứa hLAG-3 mAb 1 VH-1 và hLAG-3 mAb 1 VL-2 được đề cập cụ thể đến là "hLAG-3 mAb 1(1.2)".

mAb được làm giống như của người độ dài đầy đủ được xây dựng cấu trúc như sau: đầu tận C của miền VL đã được làm giống như của người được dung hợp với đầu tận N của vùng kapa của chuỗi nhẹ người để tạo ra chuỗi nhẹ và mỗi chuỗi nhẹ được ghép cặp với chuỗi nặng chứa miền VH được làm giống như của người của cùng một kháng thể được dung hợp với đầu tận N của vùng hằng định của IgG1 người chứa các đoạn thay thế L234A/L235A (AA) hoặc vùng hằng định của IgG4 người chứa đoạn thay thế S228P.

Trình tự axit amin của vùng hằng định của IgG1 người chứa các đoạn thay thế L234A/L235A (AA) được nêu làm ví dụ (SEQ ID NO:139):

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGX
```

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt

Trong SEQ ID NO:139, các gốc axit amin từ 1 đến 98 tương ứng với miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO:120), các gốc axit amin từ 99 đến 113 tương ứng với vùng bản lề của IgG1 (SEQ ID NO: 114) và các gốc axit amin từ 114 đến 329 tương ứng với miền CH2-CH3 của IgG1chứa các đoạn thay thế L234A/L235A (được gạch chân) (SEQ ID NO:123).

Trình tự axit amin của vùng hằng định của IgG4 người chứa đoạn thay thế S228P được nêu làm ví dụ (SEQ ID NO:140):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGX

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có mặt

Trong SEQ ID NO:140, các gốc axit amin từ 1 đến 98 tương ứng với miền CH1 của IgG4 (SEQ ID NO:122), các gốc axit amin từ 99 đến 110 tương ứng với vùng bản lề của IgG4 đã được làm ổn định chứa đoạn thay thế S228P (được gạch chân) (SEQ ID NO: 117) và các gốc axit amin từ 111 đến 326 tương ứng với miền CH2-CH3 của IgG4 (SEQ ID NO:4).

Động học liên kết của các kháng thể LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, LAG-3 mAb 6, một vài kháng thể được làm giống như của người và kháng thể tham chiếu LAG-3 mAb A được nghiên cứu bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tích Biacore. Các kháng thể kháng LAG-3 được thu giữ và được ủ với LAG-3 người có thể hòa tan được gắn đuôi His (shLAG-3-His) và động học liên kết được xác định thông qua phân tích Biacore. ka, kd và KD đã tính được thể hiện trong Bảng 7.

| Bảng 7 | | | |
|---|---|---|---|
| Kháng thể kháng LAG-3 | $k_a$ ($x10^5$) | $k_d$ ($x10^{-4}$) | KD (nM) |
| LAG-3 mAb A | 8,7 | 5,4 | 0,6 |
| LAG-3 mAb 1[a] | 20 | 0,26 | 0,013 |
| LAG-3 mAb 1[b] | 31 | 0,27 | 0,01 |
| LAG-3 mAb 2[a] | 11 | 21 | 1,9 |
| LAG-3 mAb 3[a] | 7,7 | 34 | 4,4 |
| LAG-3 mAb 4[a] | 12 | 9,3 | 0,8 |
| LAG-3 mAb 5[a] | 14 | 13 | 0,9 |
| LAG-3 mAb 6[a] | 42 | 0,84 | 0,02 |
| hLAG-3 mAb 1 (1.2)[d, e] | 23 | 0,13 | 0,01 |
| hLAG-3 mAb 1 (2.2)[d, e] | 8,2 | 2,6 | 0,3 |
| hLAG-3 mAb 1 (1.1)[d, e] | 17 | 0,74 | 0,04 |
| hLAG-3 mAb 1 (1.4)[c, e] | 16 | 0,59 | 0,04 |
| hLAG-3 mAb 1 (1.4)[c, f] | 17 | 0,86 | 0,05 |

| | |
|---|---|
| a = được thu giữ trên Fc dê kháng chuột của Fab2 được cố định | b = được thu giữ trên protein G được cố định |
| c = được thu giữ trên Fc dê kháng người của Fab2 được cố định | d = được thu giữ trên protein A được cố định |
| e = IgG1 ở người (AA) | f = IgG4 (S228P) |

Trong các nghiên cứu bổ sung, động học liên kết của các kháng thể được làm giống như của người hLAG-3 mAb 1 (1.4) và hLAG-3 mAb 6 (1.1), và kháng thể tham chiếu LAG-3 mAb A với cả LAG-3 ở người và khỉ đầu chó được nghiên cứu bằng cách sử dụng phân tích Biacore. Trong các nghiên cứu này, protein dung hợp LAG-3 có thể hòa tan (miền ngoại bào của LAG-3 ở người hoặc khỉ đầu chó được dung hợp với IgG2a ở chuột) được thu giữ trên bề mặt Fc của Fab2 dê kháng chuột và được ủ với kháng thể kháng LAG-3 và động học liên kết được xác định thông qua phân tích Biacore. Đường cong liên kết đối với LAG-3 mAb A, hLAG-3 mAb 1 (1.4) và hLAG-3 mAb 6 (1.1) liên kết với LAG-3 ở khỉ đầu chó được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 7A đến Fig. 7C một cách tương ứng, và ka, kd và KD đã tính được được thể hiện trong Bảng 8. Trong một nghiên cứu khác, khả năng liên kết của kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc đặc hiệu kép bao gồm hLAG-3 mAb 6 (1.1) với cả LAG-3 ở người và khỉ đầu chó được nghiên cứu bằng cách sử dụng phân tích Biacore. Trong nghiên cứu này, kháng tổ hợp kép chứa hLAG-3 mAb 6 (1.1) được kết hợp trên bề mặt của Fc dê kháng người của $Fab_2$ và được ủ với protein dung hợp của LAG-3 có thể hòa tan (miền ngoại bào của LAG-3 ở người hoặc khỉ đầu chó được dung hợp với đuôi His) và động học liên kết được xác định thông qua phân tích Biacore. Ka, kd và KD đã tính được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8

| Kháng thể kháng LAG-3 | Người | | | Khỉ đầu chó | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $k_a$ ($x10^4$) | $k_d$ ($x10^{-5}$) | KD (nM) | $k_a$ ($x10^4$) | $k_d$ ($x10^{-5}$) | KD (nM) |
| LAG-3 mAb A | 6,2 | 1,0 | 0,16 | 2,4 | 1100 | 458 |
| hLAG-3 mAb 1 (1.4)[a] | 3,4 | <1,0 | <0,29 | 1,9 | <1,0 | <0,53 |
| hLAG-3 mAb 6 (1.1)[a] | 9,9 | <1,0 | <0,1 | 8,2 | 30 | 3,7 |
| hLAG-3 mAb 6 (1.1)[b] | 480 | 16 | 0,033 | 59 | 78 | 0,13 |

a = protein dung hợp IgG2a của chuột-LAG-3 của người hoặc khỉ đầu chó được cố định

b = kháng tổ hợp kép chứa vùng Fc được cố định chứa miền liên kết epitop - hLAG-3 mAb 6 (1.1)

Các kết quả này chứng minh rằng LAG-3 mAb 1 và LAG-3 mAb 6 có động học liên kết tốt hơn so với kháng thể tham chiếu LAG-3 mAb A. Ngoài ra, LAG-3

mAb 6 được làm giống như của người có động học liên kết phản ứng chéo tốt hơn với LAG-3 ở khỉ đầu chó.

Tính đặc hiệu epitop của LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 và kháng thể tham chiếu LAG-3 mAb A được kiểm tra bằng cách sử dụng phân tích Biacore. Để xác định xem các kháng thể này có liên kết với các epitop LAG-3 khác nhau không, thì shLAG-3-His được thu giữ bằng kháng thể chuột kháng PentaHis được cố định trên chíp cảm biến CM5 theo quy trình được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Nói một cách ngắn gọn, nhóm carboxyl trên bề mặt chíp cảm biến được hoạt hóa bằng cách phun dung dịch chứa N-etyl-N-(3dietylamino-propyl) carbodimit 0,2M và N-hydroxy-sucxinimit 0,05M. Kháng thể kháng PentaHis được phun lên trên bề mặt CM5 đã hoạt hóa trong natri-axetat 10mM, độ pH = 5,0, ở tốc độ dòng chảy 5μL/phút, sau đó đến etanolamin 1M để bất hoạt nhóm phản ứng amin còn lại. Các thử nghiệm liên kết được thực hiện trong chất đệm HBS-EP, chứa HEPES 10mM, độ pH = 7,4, NaCl 150mM, EDTA 3mM, và chất hoạt động bề mặt P20 0,005%. Mỗi kháng thể (LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 và LAG-2 mAb A) được phun trước lên trên hLAG3-His đã được thu giữ trong thời gian 180 giây ở tốc độ dòng chảy bằng 5μL/phút ở nồng độ bằng 1μM sau đó chạy dung dịch đệm và phun kháng thể cạnh tranh trong cùng điều kiện. Đáp ứng liên kết của kháng thể cạnh tranh được so sánh với đáp ứng liên kết của nó với hLAG3-His đã được phun trước với dung dịch đệm để nhận biết các kháng thể cạnh tranh cho cùng một epitop. Việc tái tạo bề mặt kháng PentaHis đã cố định được thực hiện bằng cách phun theo xung glyxin 10mM, độ pH = 1,5. Đường cong tham chiếu thu được bằng cách phun các chất phân tích trên bề mặt đã được xử lý mà không có protein được cố định. Đường cong liên kết được tạo ra bằng phần mềm đánh giá BIA (BIAevaluation) v4.1 từ dữ liệu biểu đồ cảm biến thời gian thực.

Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 8A đến Fig. 8D. Các kết quả của thử nghiệm này cho thấy rằng kháng thể được biotinyl hóa LAG3 mAb A có khả năng liên kết với shLAG-3-His ngay cả khi có lượng dư của các kháng thể không được biotinyl hóa LAG-3 mAb 1 và LAG-3 mAb 6. Ngược lại, LAG-3 mAb 1 phong bế sự liên kết của LAG-3 mAb 6. Vì vậy, các kết quả này cho thấy rằng LAG-3 mAb 1 và LAG-3 mAb 6 có thể liên kết với cùng một epitop, hoặc trên các epitop chồng lên nhau của LAG-3, và cạnh tranh với một epitop khác để

liên kết với LAG-3. Cả LAG-3 mAb 1 và LAG-3 mAb 6 đều được phát hiện ra là liên kết với epitop khác với epitop được liên kết bằng LAG-3 mAb A.

Để mô tả hơn nữa đặc điểm của kháng thể kháng LAG3, khả năng của chúng trong việc phong bế liên kết giữa LAG-3 và MHC lớp II được đánh giá trong hai thử nghiệm khác nhau. Trong một thử nghiệm, khả năng của các kháng thể để phong bế liên kết của protein dung hợp LAG3-Fc ở người có thể hòa tan với MHC lớp II đã được cố định trên bề mặt được kiểm tra. Đối với thử nghiệm này, mỗi trong số LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, và LAG-3 mAb 5 (ở lượng từ 0 đến 67 nM, pha loãng theo dãy gấp 2 lần) được trộn với protein dung hợp Fc-LAG-3 ở người có thể hòa tan, (ở nồng độ 5μg/mL) và được ủ riêng rẽ với MHC lớp II đã được cố định (1μg/mL). Lượng LAG-3 liên kết với MHC lớp II đã cố định được đánh giá bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp của dê kháng gama-HRP của người. Trong các thử nghiệm bổ sung, LAG-3 mAb A và các kháng thể được làm giống như của người, hLAG-3 mAb 1 (1.4) và hLAG-3 mAb 6 (1.1) (ở lượng từ 0,0096 đến 7,0 nM, pha loãng theo dãy gấp ba lần) được trộn với protein dung hợp His - LAG-3 ở người có thể hòa tan (0,2μg/ml) và được thử nghiệm về khả năng liên kết với MHC lớp II đã cố định như được mô tả ở trên. Các kết quả của các thử nghiệm này được thể hiện trên Fig. 9A và Fig. 9B.

Trong một thử nghiệm khác, khả năng của các kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế để phong bế liên kết của protein dung hợp LAG3-Fc ở người có thể hòa tan (shLAG-3-Fc) với MHC lớp II tự nhiên trên bề mặt tế bào được kiểm tra. Đối với thử nghiệm này, mỗi trong số LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 2, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 5, và kháng thể tham chiếu LAG-3 mAb A (ở lượng từ 0,1 đến 26,7 ng/ml, pha loãng theo dãy gấp 2 lần) được trộn với protein dung hợp Fc- LAG-3 ở người có thể hòa tan đã được biotinyl hóa, (ở nồng độ 0,5μg/ml) và được ủ riêng với tế bào Daudi dương tính với MHC II. Lượng LAG-3 liên kết với bề mặt của các tế bào Daudi được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp Streptavidin được tiếp hợp PE bằng phân tích FACS. Trong các thử nghiệm riêng rẽ bổ sung, LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 6 và LAG-3 mAb A; hoặc LAG-3 mAb 1 và các kháng thể được làm giống như của người, hLAG-3 mAb 1 (1.4), hLAG-3 mAb 1 (1.2), hLAG-3 mAb 1 (2.2), và hLAG-3 mAb 1 (1.1) được thử nghiệm như được

mô tả ở trên. Các kết quả của các thí nghiệm này được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 10A đến Fig. 10C, một cách tương ứng.

Các kết quả của các thử nghiệm ức chế này (các hình vẽ từ Fig. 9A đến Fig. 9B và từ Fig. 10A đến Fig. 10C) cho thấy rằng tất cả các kháng thể kháng LAG-3 đã được thử nghiệm đều phong bế liên kết của protein dung hợp shLAG-3-Fc để liên kết với MHC lớp II.

Ví dụ 2: Phương pháp đếm tế bào theo dòng

Các thí nghiệm để xác định mức độ biểu hiện của các chất ức chế điểm kiểm tra: PD-1 và LAG-3 trên các tế bào trong thử nghiệm được mô tả dưới đây sử dụng các kháng thể có bán trên thị trường được đánh dấu huỳnh quang một cách thích hợp sau đây (phycoerythrin-xyanin7 (PE-Cy7) đã tiếp hợp các đối chứng kháng CD4 [dòng vô tính SK3] hoặc kháng CD4 đã tiếp hợp fluoresxein isothioxyanat (FITC) [dòng vô tính RPA-T4], kháng LAG-3 đã tiếp hợp phycoerythrin (PE) [dòng vô tính 3DS223H], kháng PD-1 đã liên hợp phycoerythrin (PE) [dòng vô tính EH12.2H7] hoặc tiếp hợp alophycoxyanin (APC) (eBiosciences, hoặc BioLegend)) và các đối chứng isotyp thích hợp. Tất cả các kháng thể đều được sử dụng ở nồng độ được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Việc nhuộm tế bào được thực hiện trong dung dịch đệm FACS (FCS 10% trong PBS) trên đá trong thời gian 30 phút trong bóng tối để bổ sung các kháng thể sơ cấp. Sau hai lần rửa, các tế bào được nhuộm bằng chất phản ứng thứ cấp thích hợp trên đá trong thời gian 30 phút trong bóng tối hoặc được phân tích ngay trên thiết bị đếm tế bào theo dòng. Để loại bỏ các tế bào chết, tất cả các mẫu đều được nhuộm đồng thời bằng thuốc nhuộm khả năng sống sót: 7-Aminoactinomyxin D (7-AAD) (BD Biosceinces, hoặc BioLegend,) hoặc 4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydroclorua (DAPI) (Life Technologies). Tất cả các mẫu được phân tích trên thiết bị đếm tế bào theo dòng FACS Calibur hoặc Fortessa (BD Biosciences) và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

Ví dụ 3: Sự biểu hiện LAG-3 và kháng thể liên kết với tế bào T được kích thích

Sự biểu hiện LAG-3 và khả năng của các kháng thể LAG-3 đã phân lập trong việc liên kết đặc hiệu với LAG-3 trên bề mặt của tế bào T đã kích thích bằng

CD3/CD28 được kiểm tra. Các tế bào T được thu từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), nói một cách ngắn gọn thì, PBMC được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm có gradien mật độ Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất từ máu toàn phần thu được có sự chấp thuận được thông báo từ các đối tượng cho khỏe mạnh (Biological Specialty Corporation) và sau đó các tế bào T được tinh chế bằng cách sử dụng kit chứa các tế bào T ở người Dynabeads® Untouched (Life Technologies) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Để kích thích, các tế bào T đã phân lập được nuôi cấy trong thời gian từ 10 đến 14 ngày khi có mặt IL-2 người tái tổ hợp 30U/ml] (Peprotech) và các hạt chất hoạt hóa tế bào T ở người Dynabeads® (Life Technologies) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Việc biểu hiện LAG-3 trên các tế bào T CD4+ không được kích thích mới phân lập, và tế bào T CD4+ được kích thích (được lấy từ môi trường nuôi cấy vào ngày 11 hoặc 14), được kiểm tra bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng như được mô tả ở trên, sử dụng kháng thể kháng CD4 đã tiếp hợp FITC và kháng LAG-3 đã tiếp hợp PE.

Các kết quả của các nghiên cứu này được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 11A đến Fig. 11C. Không quan sát thấy có sự biểu hiện của LAG-3 trên các tế bào T CD4+ không được kích thích (Fig. 11A). Tuy nhiên, tế bào T CD4+ được kích thích CD3/CD8 từ hai đối tượng cho khác nhau (D:58468 và D:43530) lại có sự tăng đáng kể ở mức biểu hiện LAG-3 (Fig. 11B và Fig. 11C).

Khả năng của LAG-3 mAb 1 (Fig. 12, hình A và hình D), LAG-3 mAb 2 (Fig. 12, hình B và hình E), LAG-3 mAb 3 (Fig. 12, hình C và hình F), LAG-3 mAb 4 (Fig. 13, hình A và hình C), và LAG-3 mAb 5 (Fig. 13, hình B và hình D) trong việc liên kết đặc hiệu với tế bào T CD4+ đã kích thích được nghiên cứu. Tế bào T đã kích thích (được chuẩn bị như được mô tả ở trên từ đối tượng cho D:58468) được lấy từ môi trường nuôi cấy vào ngày 14, và tế bào mới không được kích thích (được chuẩn bị như được mô tả ở trên từ đối tượng cho D:43530) được đưa vào đếm tế bào theo dòng bằng cách sử dụng các kháng thể kháng LAG-3 đã phân lập và chất phản ứng thứ cấp được đánh dấu huỳnh quang một cách thích hợp sau đây (kháng IgG chuột nhắt đã tiếp hợp PC(H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs)) và kháng CD4 đã tiếp hợp FITC. Như được thể hiện trên Fig. 12, các hình A-F và Fig. 13, các hình A-D,

mỗi kháng thể kháng LAG-3 được kiểm tra chỉ liên kết với các tế bào T CD4+ được kích thích, mà không liên kết với các tế bào T CD4+ không được kích thích.

Các kết quả của các nghiên cứu này chứng minh rằng LAG-3 được điều hòa tăng trên tế bào T được kích thích và các kháng thể kháng LAG-3 theo sáng chế chỉ liên kết đặc hiệu với tế bào T được kích thích.

Ví dụ 4: Hoạt tính chức năng của kháng thể kháng LAG

Độc tố trong ruột *Staphylococcus aureus* typ B (SEB) là siêu kháng nguyên vi trùng có khả năng hoạt hóa một tỷ lệ lớn các tế bào T (từ 5 đến 30%). SEB liên kết với MHC II bên ngoài khóm liên kết peptit và do đó phụ thuộc vào MHC II, nhưng không bị hạn chế và được điều tiết bởi TCR. Sự kích thích bằng SEB của tế bào T dẫn đến sự tăng sinh tế bào T ít clon và sản sinh xytokin (mặc dù có thể quan sát thấy khả năng biến đổi của đối tượng cho). Việc biểu hiện các kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng PD-1 một mình và trong tổ hợp trên PMBC kích thích bằng SEB được kiểm tra.

PBMC được tinh chế như được mô tả ở trên được nuôi cấy trong môi trường RPMI + FBS đã bất hoạt bằng nhiệt 10% + Penixilin/Streptomyxin 1% trong bình liền khối T-25 trong thời gian từ 2 đến 3 ngày một mình hoặc với SEB (Sigma-Aldrich) ở nồng độ 0,1ng/ml (kích thích sơ cấp). Ở cuối vòng kích thích SEB thứ nhất, PBMC được rửa hai lần bằng PBS và ngay lập tức được dàn trên đĩa trong đĩa nuôi cấy mô có 96 lỗ ở nồng độ bằng 1-5 x $10^5$ tế bào/lỗ trong môi trường một mình, môi trường với SEB ở nồng độ 0,1ng/ml (kích thích thứ cấp) và không có kháng thể, hoặc môi trường với SEB và kháng thể IgG đối chứng, và được nuôi cấy trong thời gian từ 2 đến 3 ngày nữa. Tại thời điểm 48 giờ sau kích thích SEB khối sơ cấp, các tế bào được kiểm tra về mức biểu hiện PD-1 và LAG-3 bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng bằng cách sử dụng kháng LAG-3 đã tiếp hợp PE và kháng CD3 đã tiếp hợp FITC; hoặc kháng PD-1 đã tiếp hợp APC và kháng CD3 đã tiếp hợp FITC. Vào ngày 5, sau nuôi cấy thứ cấp trong đĩa có 96 lỗ có kích thích SEB, các lỗ không được xử lý bằng kháng thể hoặc được xử lý bằng kháng thể đối chứng được kiểm tra bằng cách sử dụng phân tích đếm tế bào theo dòng về sự biểu hiện PD-1 và LAG-3 bằng

cách sử dụng kháng thể kháng LAG-3 đã tiếp hợp PE và kháng thể kháng PD-1 đã tiếp hợp APC.

Các kết quả phân tích tế bào theo dòng từ hai đối tượng đại diện (D:34765 và D:53724) được thể hiện trên Fig. 14, các hình A-D (D:34765) và Fig. 15, các hình A-D (D:53724). Các kết quả này chứng minh rằng LAG-3 và PD-1 được điều hòa tăng sau kích thích SEB 48 giờ có thấy sự tăng cường hơn nữa vào ngày 5 sau nuôi cấy có kích thích SEB. Trong các nghiên cứu này, đối tượng cho 1 có nhiều tế bào dương tính kép LAG-3/PD-1 hơn sau khi kích thích SEB. Việc bổ sung kháng thể đối chứng sau kích thích bằng SEB không làm thay đổi sự biểu hiện của LAG-3 hoặc PD-1 (so sánh Fig. 14, hình C và hình D, và Fig. 15, hình C và hình D).

Việc điều hòa tăng các protein điểm kiểm tra miễn dịch LAG-3 và PD-1 sau kích thích bằng SEB của PBMC làm hạn chế sự giải phóng xytokin khi kích thích lại. Khả năng của LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, LAG-3 mAb 6, kháng thể đơn dòng PD-1 được ký hiệu là "PD-1 mAb 5", và các kháng thể tham chiếu PD-1 mAb 1 (chứa biến thể Fc 235A/235A (AA)), PD-1 mAb 2, LAG-3 mAb A, và kháng thể 17B4 kháng LAG3 có bán trên thị trường (#LS-C18692, LS Bio, được ký hiệu là "LAG-3 mAb B") trong việc tăng cường sự giải phóng xytokin thông qua ức chế điểm kiểm tra được kiểm tra.

PBMC được kích thích bằng SEB như được mô tả ở trên ngoại trừ trong khi kích thích thứ cấp, các tế bào được dàn trên đĩa không có kháng thể, với kháng thể đối chứng isotyp, hoặc với kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng PD-1 một mình hoặc kết hợp. Ở cuối quá trình kích thích lần thứ hai, các phần dịch nổi trên bề mặt được gom lại để đo mức tiết xytokin bằng cách sử dụng kit DuoSet ELISA dùng cho người đối với IFNγ, TNFα, IL-10, và IL-4 (R&D Systems) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các hình vẽ từ Fig. 16A đến Fig. 16B thể hiện IFNγ (Fig. 16A) và TNFα (Fig. 16B), profin tiết ra từ PBMC được kích thích bằng SEB từ đối tượng cho điển hình (D:38166), được xử lý mà không có kháng thể hoặc một trong các kháng thể sau: đối chứng isotyp, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, LAG-3 mAb A, LAG-3 mAb B, LAG-3 mAb 1, LAG-3 mAb 3, LAG-3 mAb 4, hoặc LAG-3 mAb 6. Đối với nghiên cứu này, các kháng thể được sử dụng ở nồng độ 0,009, 0,039, 0,156, 0,625, 2,5, 10,

và 40μg/ml. Fig. 17 thể hiện profin tiết IFNγ ra từ PBMC được kích thích bằng SEB từ một đối tượng cho điển hình khác (D:58108), được xử lý bằng: không có kháng thể; kháng thể đối chứng isotyp; PD-1 mAb 2 và/hoặc LAG-3 mAb A; PD-1 mAb 5 và/hoặc LAG-3 mAb 1; hoặc PD-1 mAb 5 và/hoặc LAG-3 mAb 3. Đối với nghiên cứu này, các kháng thể được sử dụng ở nồng độ 10μg/ml.

Các kết quả của các nghiên cứu này chứng minh rằng các kháng thể kháng PD-1 làm tăng cường đáng kể chức năng của hệ miễn dịch như được thể hiện rõ bởi sự sản sinh IFNγ (Fig. 16A và Fig. 17), và TNFα (Fig. 16B) tăng từ PBMC được kích thích bằng SEB khi kích thích lại. Ngạc nhiên là, LAG-3 mAb 1 cũng được thấy là làm tăng sự sản sinh xytokin qua nhiều đối tượng đến các mức tương đương với kháng thể kháng PD-1 trong khi kháng thể kháng LAG-3 mAb tham chiếu, LAG-3 mAb A và LAG-3 mAb B và một vài kháng thể trong số các kháng thể được phân lập (LAG-3 mAb 3, LAG-4, và LAG-6) chỉ đem lại sự tăng nhẹ mức giải phóng xytokin. Ngoài ra, việc kết hợp các kháng thể kháng LAG-3 với kháng thể kháng PD-1 dẫn đến tăng cường hơn nữa mức giải phóng xytokin (Fig. 17) từ PBMC được kích thích bằng SEB khi kích thích lại. LAG-3 mAb 1 đem lại sự tăng cường mức giải phóng xytokin lớn nhất khi được kết hợp với kháng thể kháng PD-1 so với LAG-3 mAb 3 và kháng thể tham chiếu LAG-3 mAb A.

Ví dụ 5: Liên kết với LAG-3 nội sinh ở khỉ đầu chó

Khả năng của kháng thể được làm giống như của người hLAG-3 mAb 6 (1.1), và kháng thể tham chiếu LAG-3 mAb A trong việc liên kết với LAG-3 nội sinh biểu hiện trên PBMC ở khỉ đầu chó được nghiên cứu bởi phương pháp FACS. Đối với nghiên cứu này, PBMC được phân lập từ máu toàn phần của đối tượng cho là khỉ đầu chó và được nuôi cấy một mình hoặc có kích thích SEB (500ng/mL) về cơ bản là như được mô tả ở trên. Tại thời điểm 66 giờ sau khi kích thích SEB, các tế bào (không được kích thích và được kích thích) được nhuộm bằng các kháng thể hLAG-3 mAb 6 (1.1), LAG-3 mAb A, hoặc PD-1 mAb 1 (pha loãng theo thứ tự gấp 10 lần). Các kháng thể được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp được đánh dấu Fc-APC ở dê kháng người. Mức liên kết được vẽ biểu đồ trên các hình vẽ từ Fig. 18A đến Fig. 18B đối với hai đối tượng cho là khỉ đầu chó.

Việc kích thích bằng SEB được xác nhận bằng sự biểu hiện PD-1 tăng cường như được phát hiện bằng kháng thể PD-1 mAb 1 kháng PD-1. Các kết quả của các nghiên cứu này chứng minh rằng hLAG-3 mAb 6 (1.1) liên kết với LAG-3 nội sinh biểu hiện trên bề mặt của PBMC ở khỉ đầu chó được kích thích.

Tất cả các công bố đơn sáng chế và patent được đề cập trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn sao cho mỗi công bố hoặc đơn sáng chế riêng lẻ được nêu một cách cụ thể và riêng rẽ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Mặc dù sáng chế đã được mô tả kết hợp với các phương án cụ thể của nó, nhưng cần hiểu rằng có thể có các cải biến khác và sáng chế này được dự định là bao gồm các biến thể, các ứng dụng, hoặc các mô phỏng bất kỳ của sáng chế mà, nói chung là, tuân theo các nguyên lý của sáng chế và bao gồm các sai khác so với sáng chế trong thực tiễn đã biết hoặc thông thường trong lĩnh vực mà sáng chế liên quan đến và có thể được áp dụng cho các dấu hiệu cơ bản được nêu ở trên.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử liên kết gen hoạt hóa tế bào lympho 3 (LAG-3) có khả năng liên kết với cả LAG-3 ở người và LAG-3 ở khỉ đầu chó, trong đó phân tử liên kết LAG-3 này bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi và miền chuỗi nhẹ biến đổi, trong đó:

miền chuỗi nặng biến đổi này bao gồm miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$ và miền $CDR_H3$, và miền chuỗi nhẹ biến đổi này bao gồm miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$, trong đó:

(A) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 1, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 1, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, và SEQ ID NO:15;

hoặc

(B) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của hLAG-3 mAb 1, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của hLAG-3 mAb 1, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:14, và SEQ ID NO:15;

hoặc

(C) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 2, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, và SEQ ID NO:33; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 2, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, và SEQ ID NO:38;

hoặc

(D) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 3, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, và SEQ ID NO:43; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 3, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, và SEQ ID NO:48;

hoặc

(E) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 4, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, và SEQ ID NO:53; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 4, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, và SEQ ID NO:58;

hoặc

(F) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 5, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, và SEQ ID NO:63; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 5, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, và SEQ ID NO:68;

hoặc

(G) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 6 VH1, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, và SEQ ID NO:73; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 6, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, và SEQ ID NO:78;

hoặc

(H) (1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 6, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, và SEQ ID NO:73; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của hLAG-3 mAb 6, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:77, và SEQ ID NO:78.

2. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 1, trong đó phân tử này là kháng thể.

3. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 2, trong đó phân tử này là kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người.

4. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 1 hoặc 3, trong đó phân tử này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO: 79, hoặc SEQ ID NO: 81.

5. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 3 hoặc 4, trong đó phân tử này bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:83, hoặc SEQ ID NO:85.

6. Phân tử liên kết LAG-3 được đánh dấu theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết LAG-3 này được đánh dấu để phát hiện LAG-3.

7. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu của phân tử liên kết LAG-3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, và chất mang dược dụng.

8. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 1, trong đó:

(1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 1, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 1, và lần lượt chứa các trình tự axit amin: SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, và SEQ ID NO:15.

9. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 8, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16 và miền biến đổi chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24.

10. Dược phẩm chứa phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 9 và chất mang dược dụng.

11. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 1, trong đó:

(1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của hLAG-3 mAb 1, và lần lượt chứa trình tự axit amin: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là CDR chuỗi nhẹ của hLAG-3 mAb 1, và lần lượt chứa trình tự axit amin: SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:14, và SEQ ID NO:15.

12. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 11, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16, và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26.

13. Dược phẩm chứa phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 12 và chất mang dược dụng.

14. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 1, trong đó:

(1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của LAG-3 mAb 6, và lần lượt chứa trình tự axit amin: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, và SEQ ID NO:73; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb 6, và lần lượt chứa trình tự axit amin: SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, và SEQ ID NO:78.

15. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 1, trong đó:

(1) miền $CDR_H1$, miền $CDR_H2$, và miền $CDR_H3$ là các CDR chuỗi nặng của hLAG-3 mAb 6, và lần lượt chứa trình tự axit amin: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, và SEQ ID NO:73; và

(2) miền $CDR_L1$, miền $CDR_L2$, và miền $CDR_L3$ là các CDR chuỗi nhẹ của hLAG-3 mAb 6, và lần lượt chứa trình tự axit amin: SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:77, và SEQ ID NO:78.

16. Phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 15, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:79, và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:83.

17. Dược phẩm chứa phân tử liên kết LAG-3 theo điểm 16 và chất mang dược dụng.

1/26

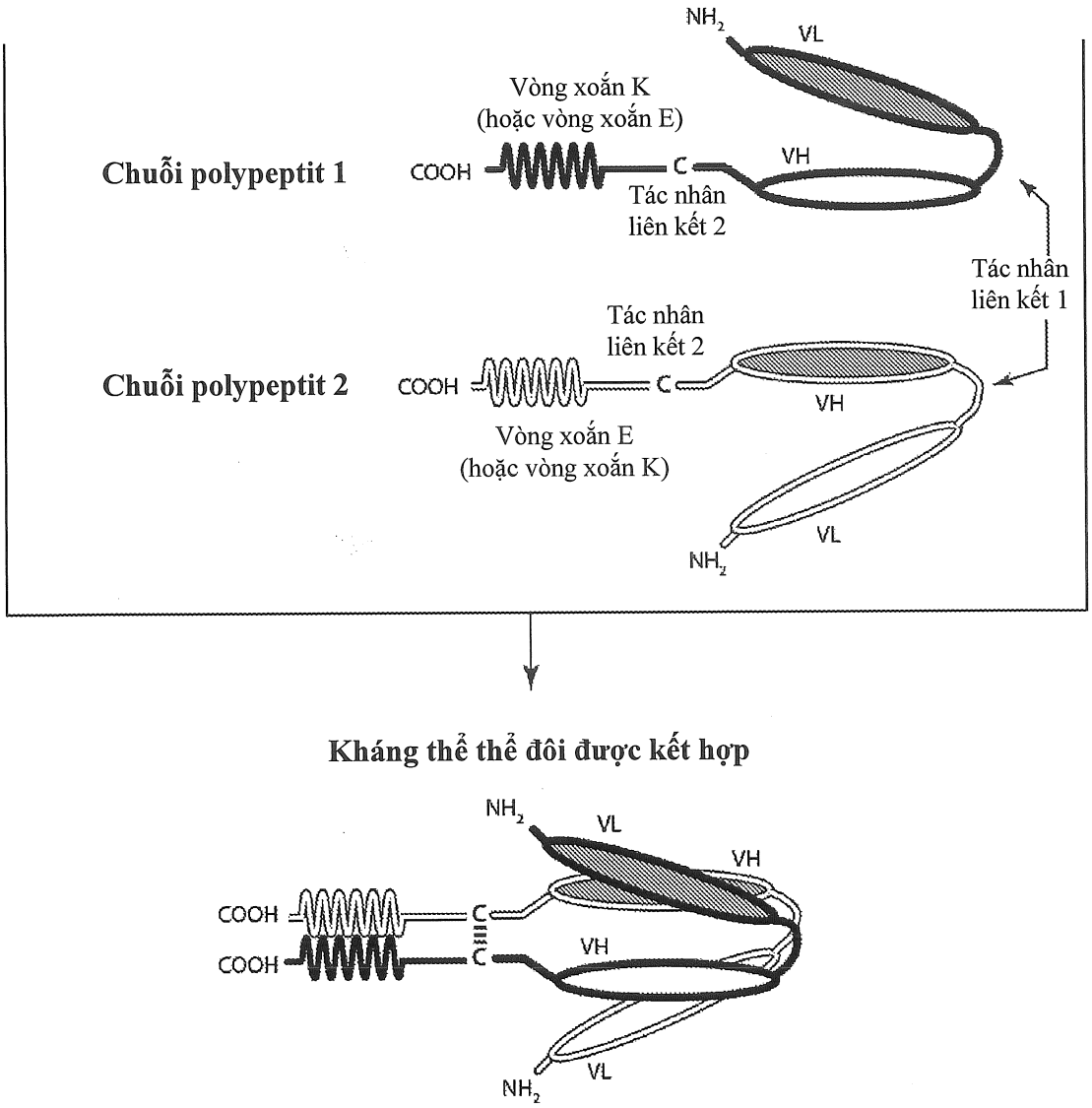

NH2
VL
Vòng xoắn K
(hoặc vòng xoắn E)
Chuỗi polypeptit 1
COOH
C
VH
Tác nhân
liên kết 2
Tác nhân
liên kết 1
Tác nhân
liên kết 2
Chuỗi polypeptit 2
COOH
C
VH
Vòng xoắn E
(hoặc vòng xoắn K)
VL
NH2
Kháng thể thể đôi được kết hợp
NH2
VL
VH
COOH
C
COOH
C
VH
NH2
VL

**Fig. 1**

2/26

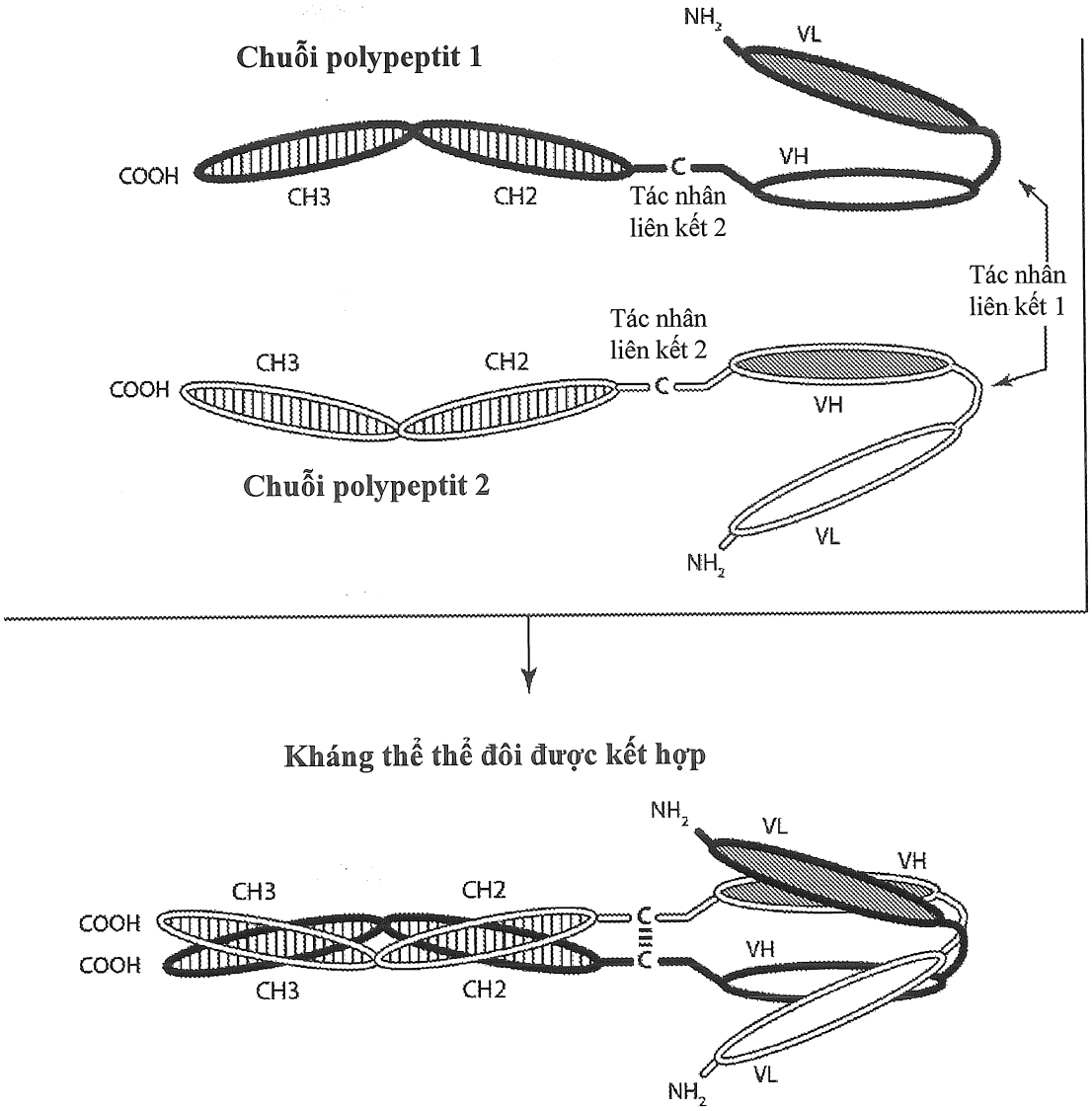

Chuỗi polypeptit 1
NH2
VL
COOH
CH3
CH2
C
VH
Tác nhân
liên kết 2
Tác nhân
liên kết 1
Tác nhân
liên kết 2
CH3
CH2
COOH
C
VH
Chuỗi polypeptit 2
VL
NH2
Kháng thể thể đôi được kết hợp
NH2
VL
VH
CH3
CH2
COOH
COOH
C
C
VH
CH3
CH2
VL
NH2

**Fig. 2**

3/26

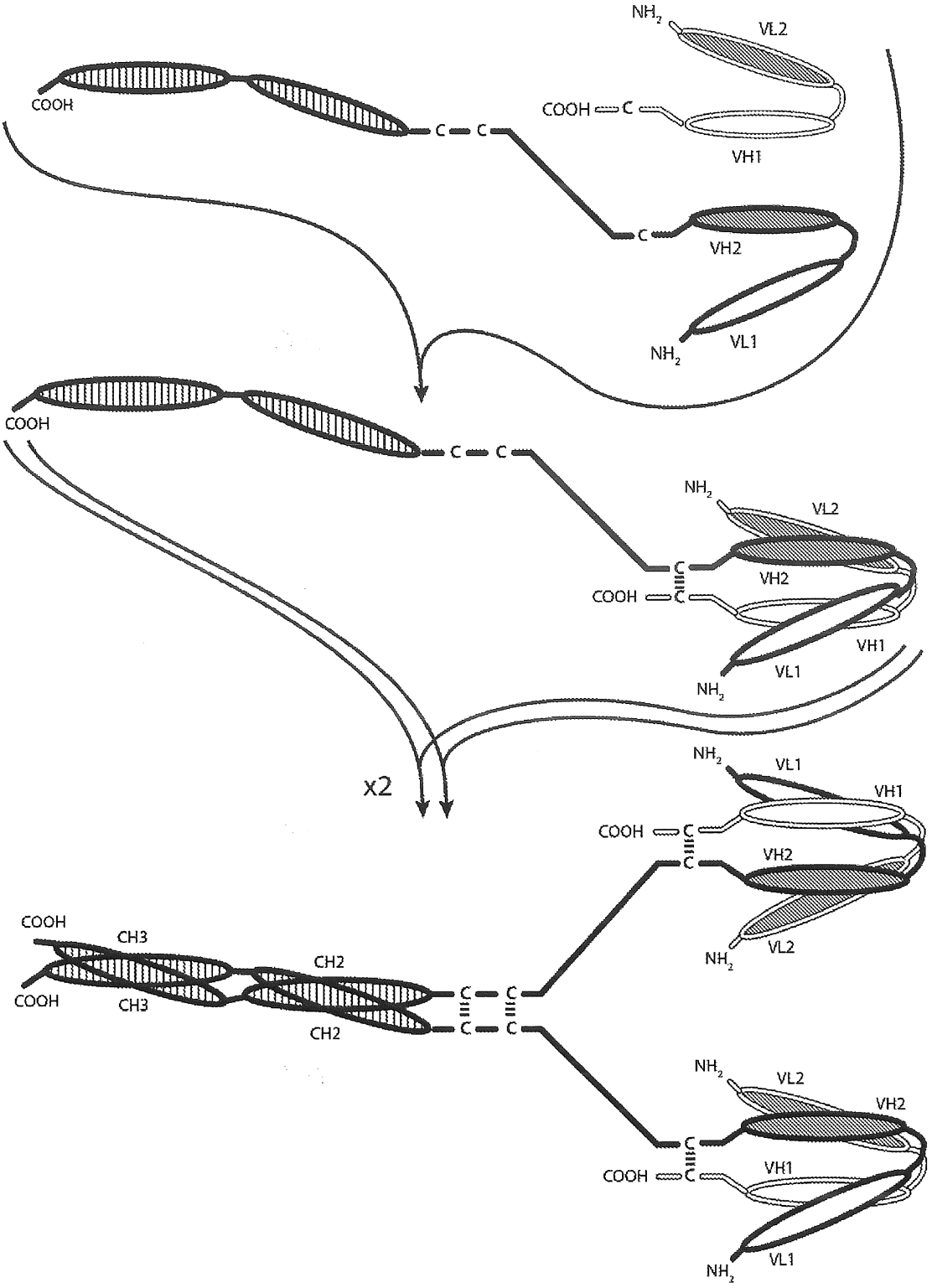

NH2
VL2
COOH
C
C
COOH
C
VH1
C
VH2
VL1
NH2
COOH
C
C
NH2
VL2
C
VH2
COOH
C
VH1
VL1
NH2
x2
NH2
VL1
VH1
COOH
C
C
VH2
NH2
VL2
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
C
C
C
C
NH2
VL2
VH2
C
C
COOH
VH1
VL1
NH2

Fig. 3A

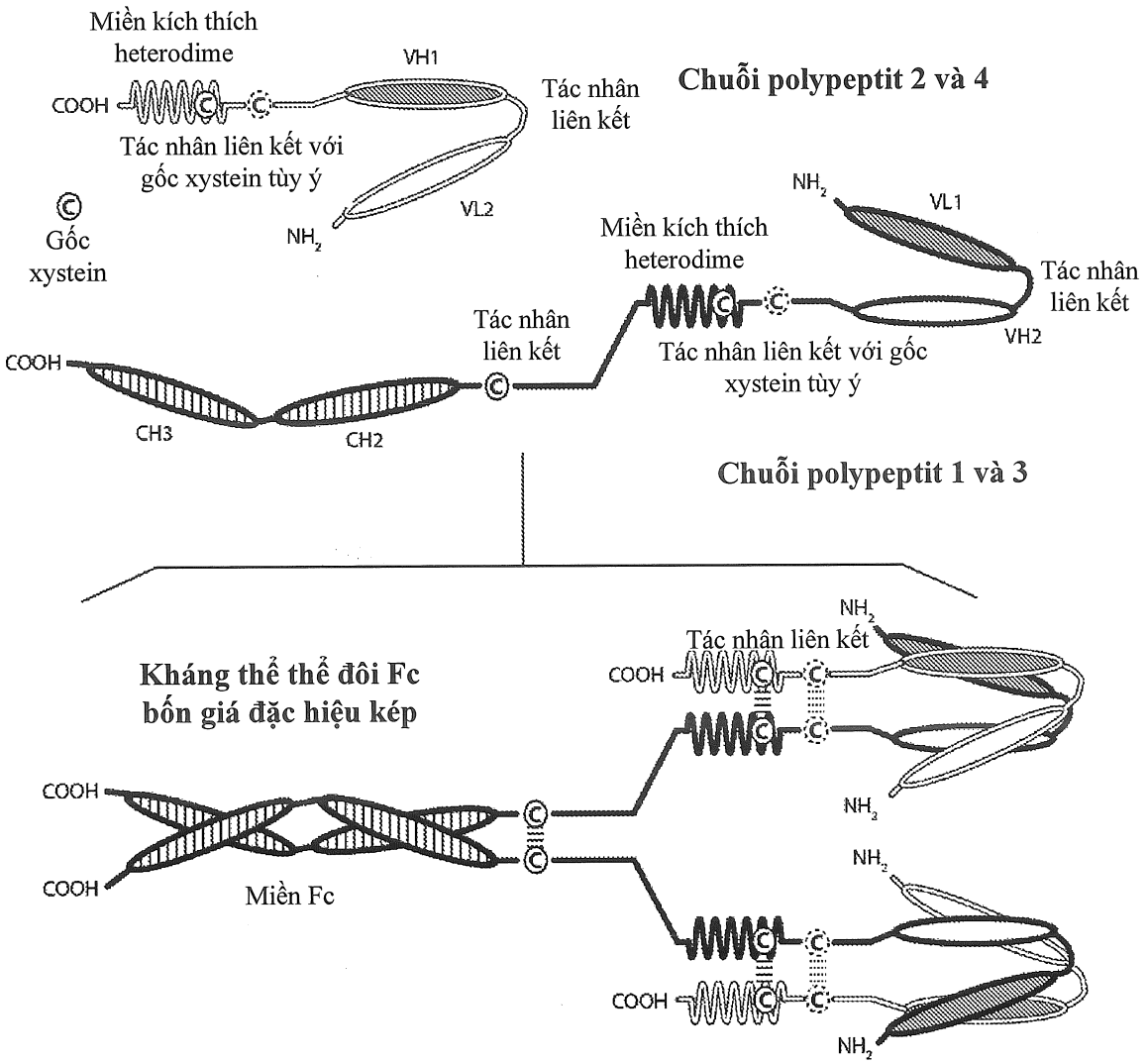

Miền kích thích heterodime
VH1
COOH
Tác nhân liên kết
Chuỗi polypeptit 2 và 4
Tác nhân liên kết với gốc xystein tùy ý
Gốc xystein
VL2
NH2
NH2
VL1
Miền kích thích heterodime
Tác nhân liên kết
Tác nhân liên kết
VH2
COOH
Tác nhân liên kết với gốc xystein tùy ý
CH3
CH2
Chuỗi polypeptit 1 và 3
NH2
Tác nhân liên kết
Kháng thể thể đôi Fc bốn giá đặc hiệu kép
COOH
COOH
COOH
Miền Fc
NH2
NH2
COOH
NH2

**Fig. 3B**

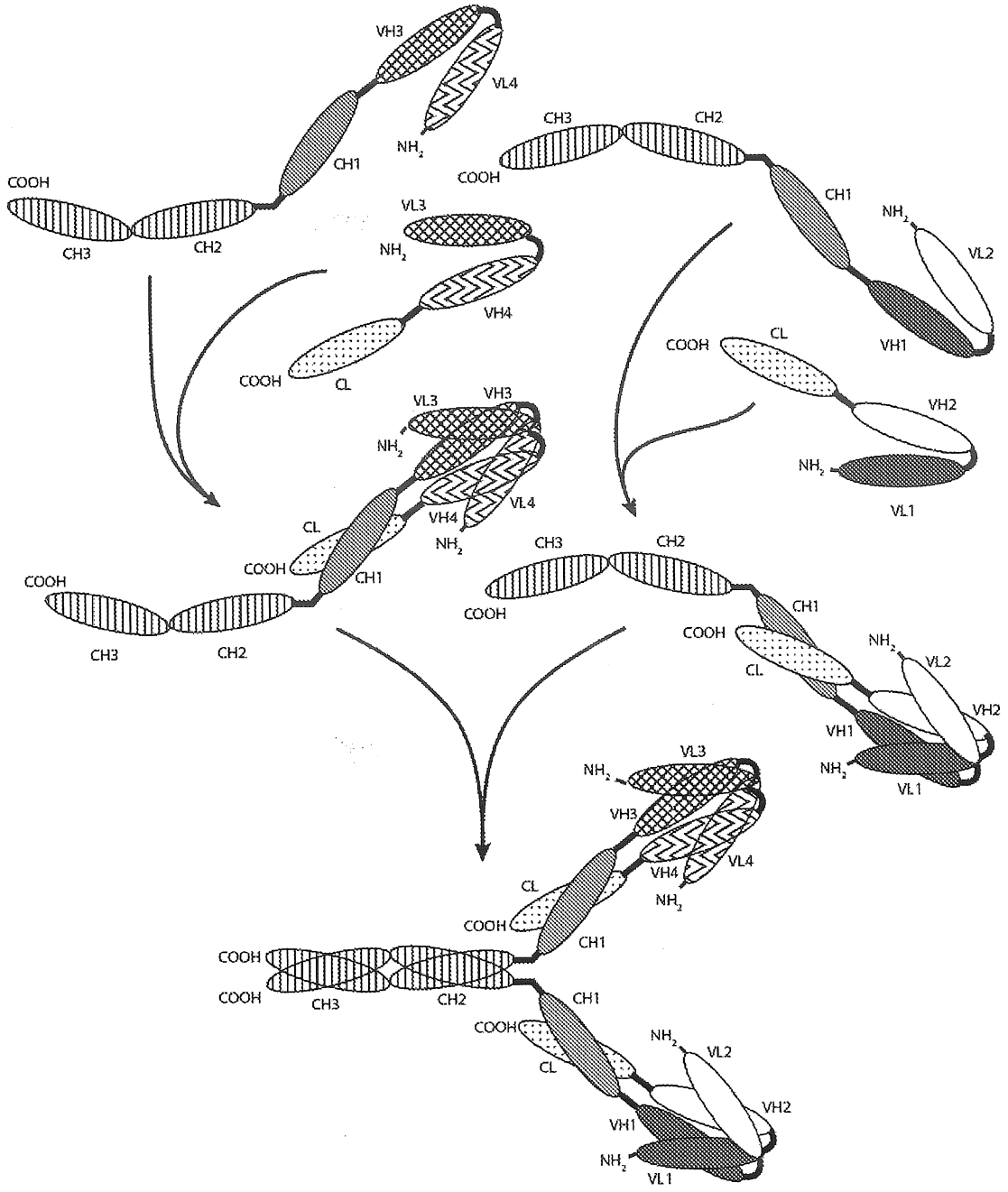

VH3
VL4
NH2
CH1
COOH
CH3
CH2
VL3
NH2
VH4
COOH
CL
CH3
CH2
COOH
CH1
NH2
VL2
VH1
COOH
CL
VH2
NH2
VL1
VL3
VH3
NH2
VL4
VH4
NH2
CL
COOH
CH1
COOH
CH3
CH2
CH3
CH2
COOH
CH1
COOH
NH2
VL2
CL
VH2
VH1
NH2
VL1
VL3
NH2
VH3
VL4
VH4
NH2
CL
COOH
CH1
COOH
COOH
CH3
CH2
CH1
COOH
NH2
VL2
CL
VH2
VH1
NH2
VL1

**Fig. 3C**

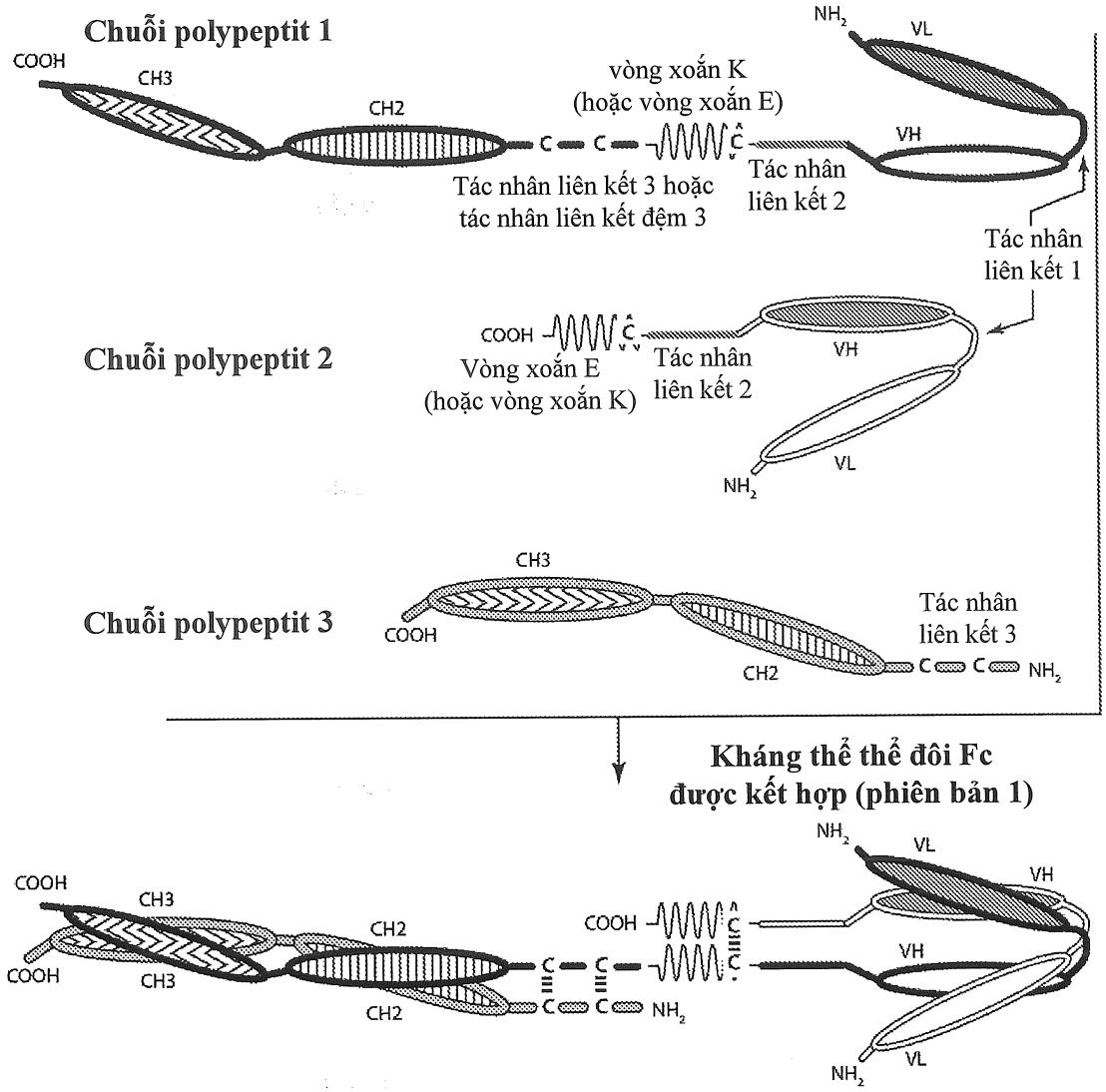

Chuỗi polypeptit 1
COOH
CH3
CH2
vòng xoắn K
(hoặc vòng xoắn E)
Tác nhân liên kết 3 hoặc
tác nhân liên kết đệm 3
Tác nhân
liên kết 2
NH2
VL
VH
Tác nhân
liên kết 1
Chuỗi polypeptit 2
COOH
Vòng xoắn E
(hoặc vòng xoắn K)
Tác nhân
liên kết 2
VH
VL
NH2
Chuỗi polypeptit 3
CH3
COOH
CH2
Tác nhân
liên kết 3
NH2
Kháng thể thể đôi Fc
được kết hợp (phiên bản 1)
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
COOH
NH2
NH2
VL
VH
VH
VL

**Fig. 4A**

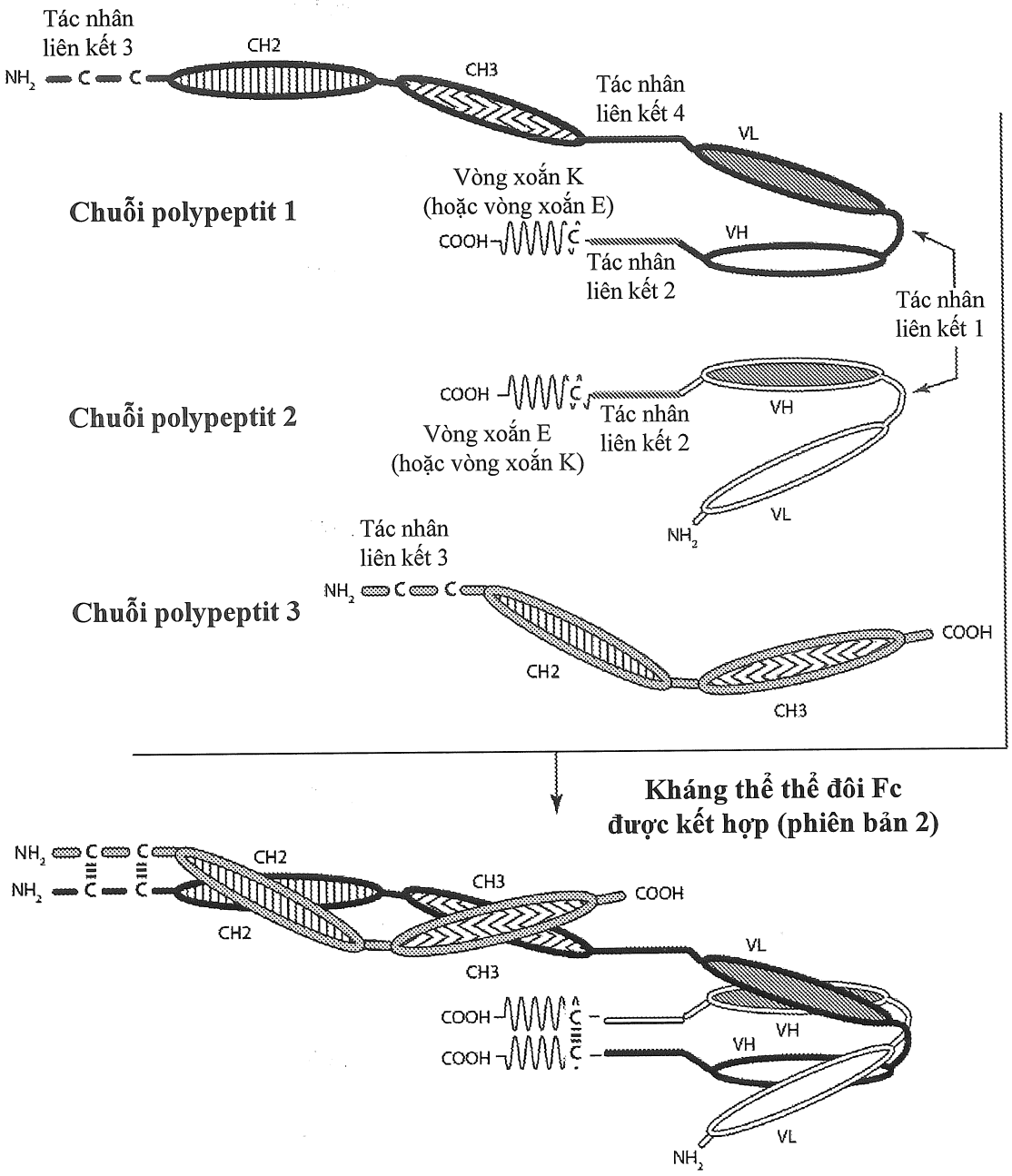

Tác nhân
liên kết 3
CH2
CH3
Tác nhân
liên kết 4
VL
Chuỗi polypeptit 1
Vòng xoắn K
(hoặc vòng xoắn E)
COOH
VH
Tác nhân
liên kết 2
Tác nhân
liên kết 1
Chuỗi polypeptit 2
COOH
Tác nhân
liên kết 2
VH
Vòng xoắn E
(hoặc vòng xoắn K)
VL
Tác nhân
liên kết 3
Chuỗi polypeptit 3
COOH
CH2
CH3
Kháng thể thể đôi Fc
được kết hợp (phiên bản 2)
CH2
CH3
COOH
CH2
VL
CH3
COOH
VH
COOH
VH
VL

**Fig. 4B**

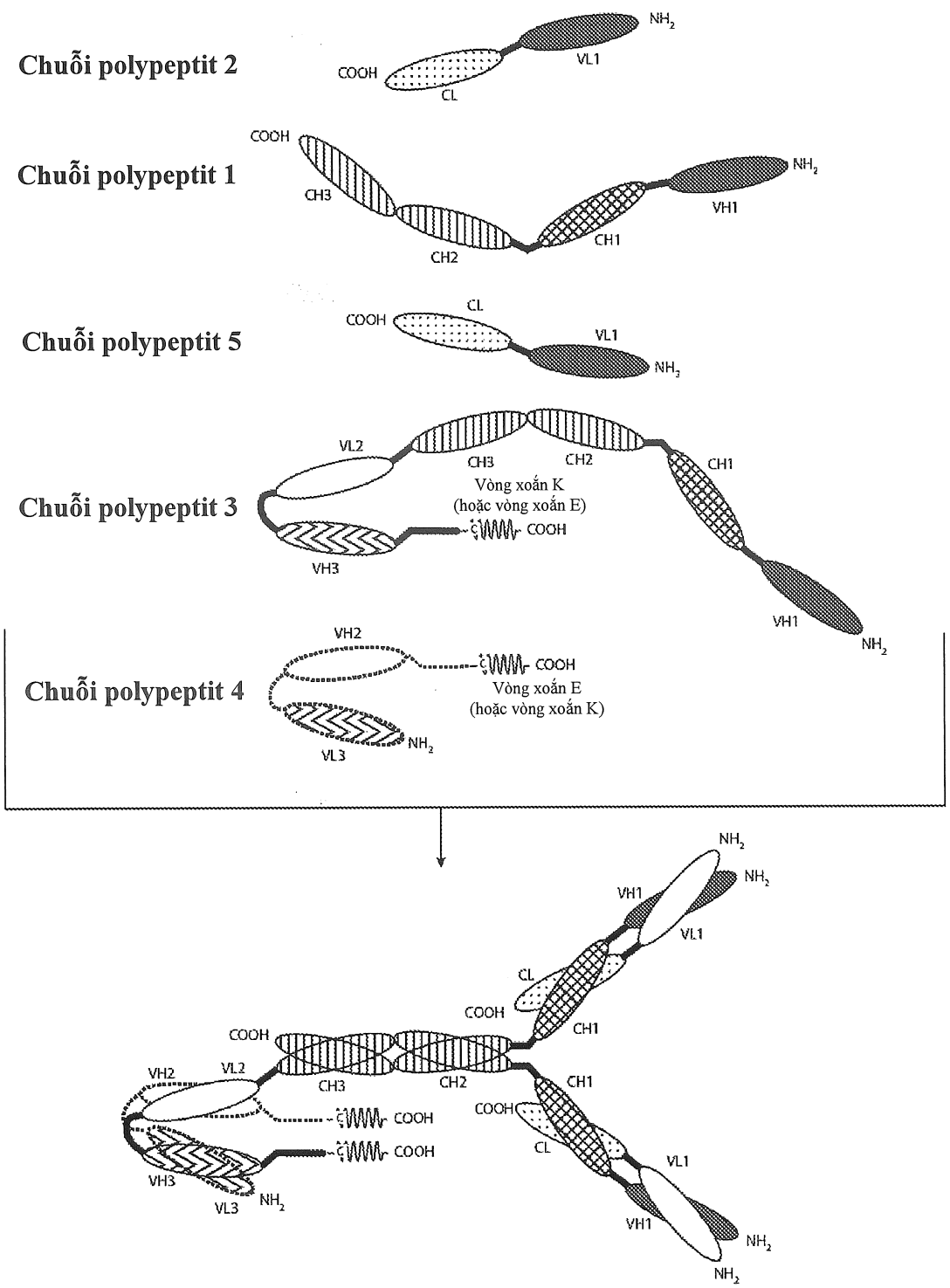

Chuỗi polypeptit 2
COOH
CL
VL1
NH2
Chuỗi polypeptit 1
COOH
CH3
CH2
CH1
VH1
NH2
Chuỗi polypeptit 5
COOH
CL
VL1
NH2
Chuỗi polypeptit 3
VL2
CH3
CH2
CH1
Vòng xoắn K
(hoặc vòng xoắn E)
COOH
VH3
VH1
NH2
Chuỗi polypeptit 4
VH2
COOH
Vòng xoắn E
(hoặc vòng xoắn K)
VL3
NH2
NH2
NH2
VH1
VL1
CL
COOH
CH1
COOH
VH2
VL2
CH3
CH2
CH1
COOH
COOH
COOH
CL
VL1
VH3
VL3
NH2
VH1
NH2
NH2

**Fig. 5**

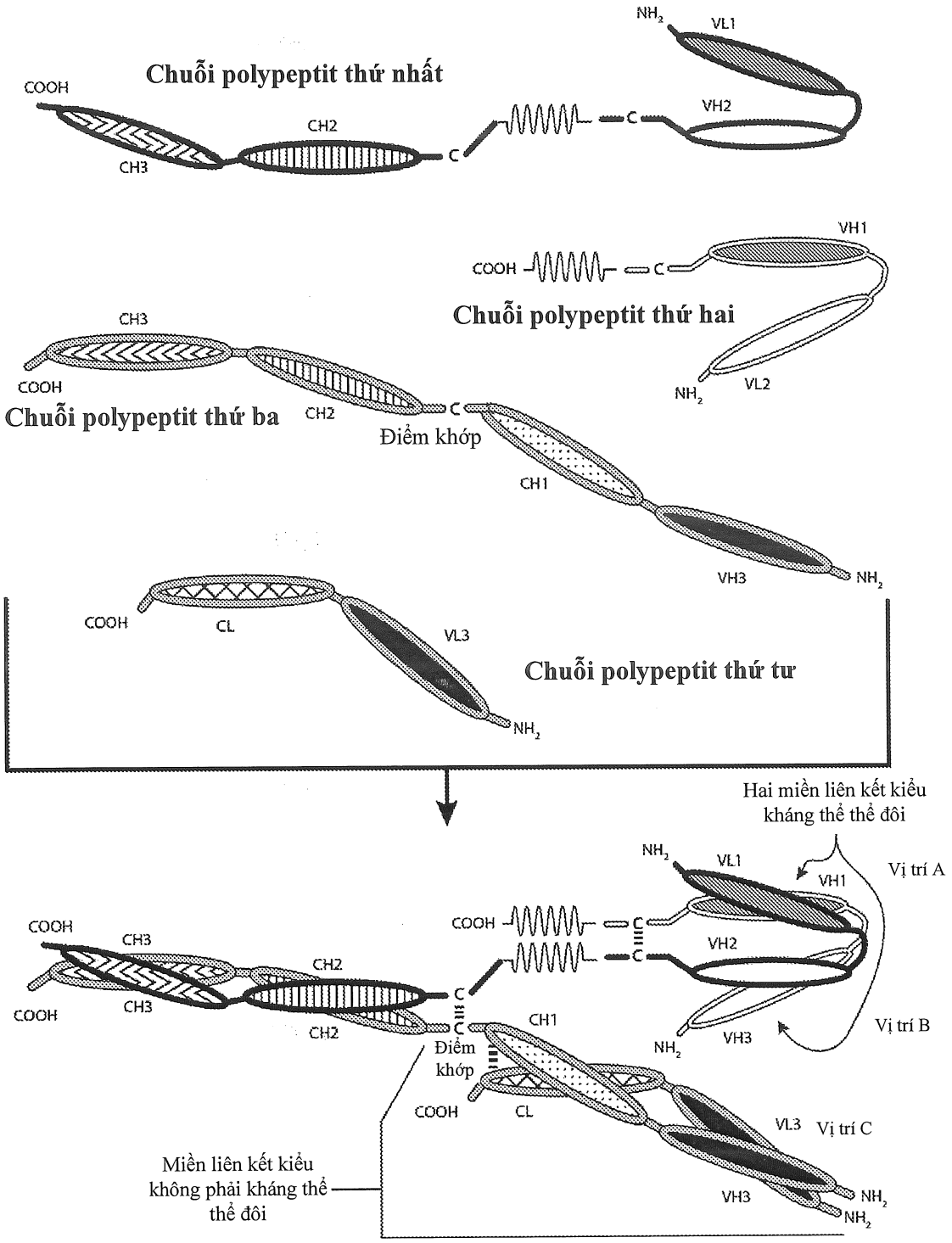

Chuỗi polypeptit thứ nhất
COOH
CH3
CH2
C
C
NH2
VL1
VH2
VH1
COOH
C
Chuỗi polypeptit thứ hai
NH2
VL2
CH3
COOH
Chuỗi polypeptit thứ ba
CH2
C
Điểm khớp
CH1
VH3
NH2
COOH
CL
VL3
Chuỗi polypeptit thứ tư
NH2
Hai miền liên kết kiểu kháng thể thể đôi
NH2
VL1
VH1
Vị trí A
COOH
CH3
COOH
CH3
CH2
CH2
C
C
COOH
C
C
VH2
CH1
Điểm khớp
NH2
VH3
Vị trí B
COOH
CL
VL3
Vị trí C
Miền liên kết kiểu không phải kháng thể thể đôi
VH3
NH2
NH2

**Fig. 6A**

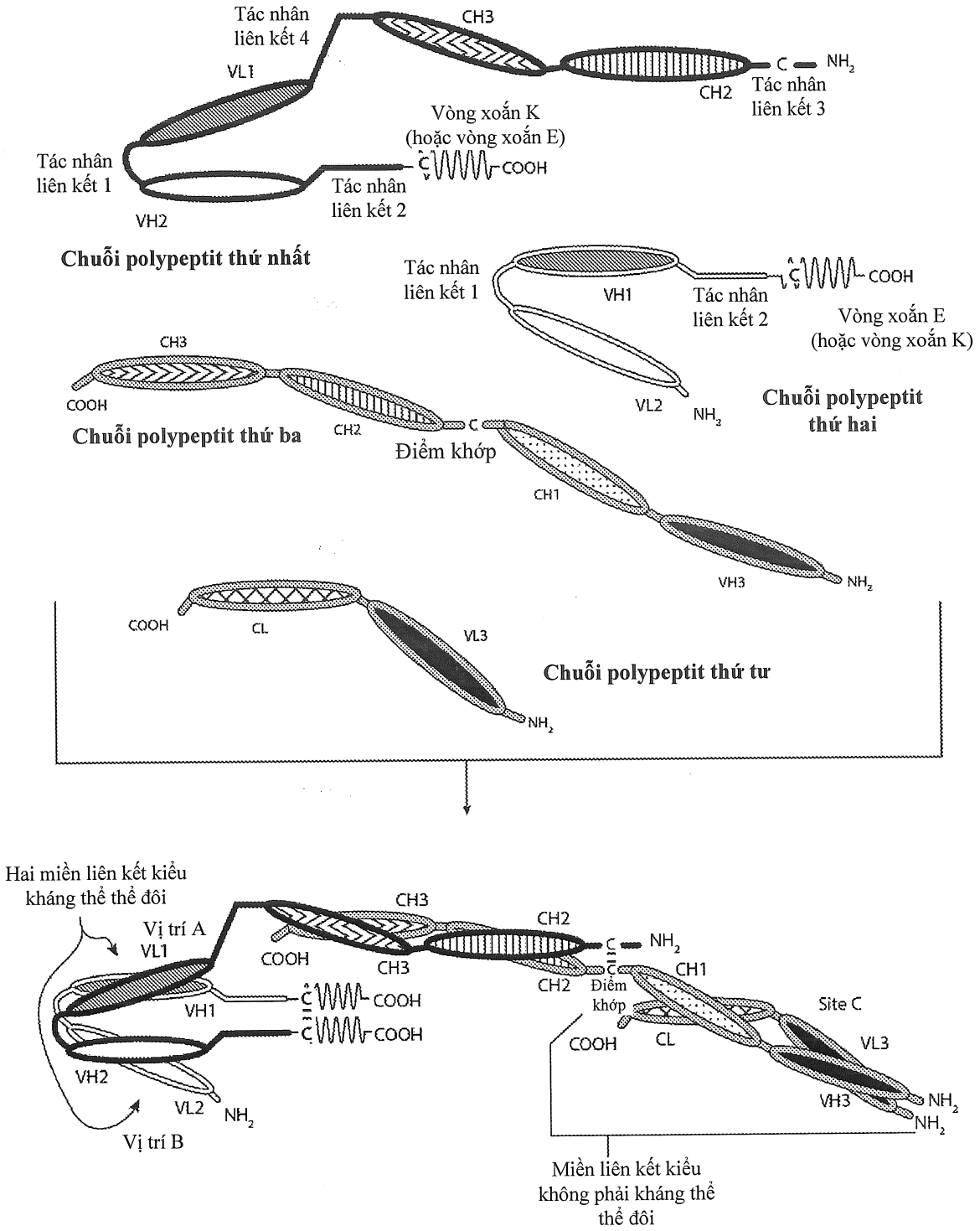

Tác nhân liên kết 4
CH3
VL1
C
NH2
CH2
Tác nhân liên kết 3
Vòng xoắn K (hoặc vòng xoắn E)
COOH
Tác nhân liên kết 1
Tác nhân liên kết 2
VH2
Chuỗi polypeptit thứ nhất
Tác nhân liên kết 1
VH1
Tác nhân liên kết 2
COOH
Vòng xoắn E (hoặc vòng xoắn K)
CH3
COOH
VL2
NH2
Chuỗi polypeptit thứ hai
Chuỗi polypeptit thứ ba
CH2
C
Điểm khớp
CH1
VH3
NH2
COOH
CL
VL3
Chuỗi polypeptit thứ tư
NH2
Hai miền liên kết kiểu kháng thể thể đôi
Vị trí A
VL1
CH3
CH2
COOH
CH3
NH2
CH1
CH2
Điểm khớp
VH1
COOH
COOH
Site C
COOH
CL
VL3
VH2
VL2
NH2
VH3
NH2
NH2
Vị trí B
Miền liên kết kiểu không phải kháng thể thể đôi

**Fig. 6B**

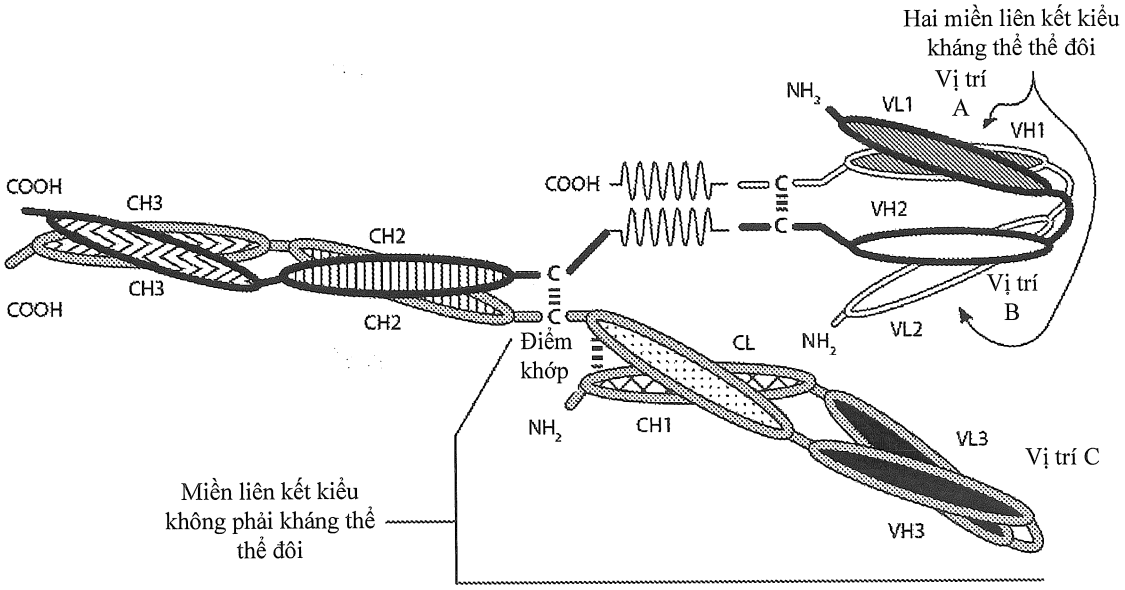

Hai miền liên kết kiểu
kháng thể thể đôi
Vị trí
A
NH3
VL1
VH1
COOH
CH3
COOH
VH2
CH2
CH3
COOH
CH2
Vị trí
B
Điểm
khớp
CL
NH2
VL2
NH2
CH1
VL3
Vị trí C
Miền liên kết kiểu
không phải kháng thể
thể đôi
VH3

**Fig. 6C**

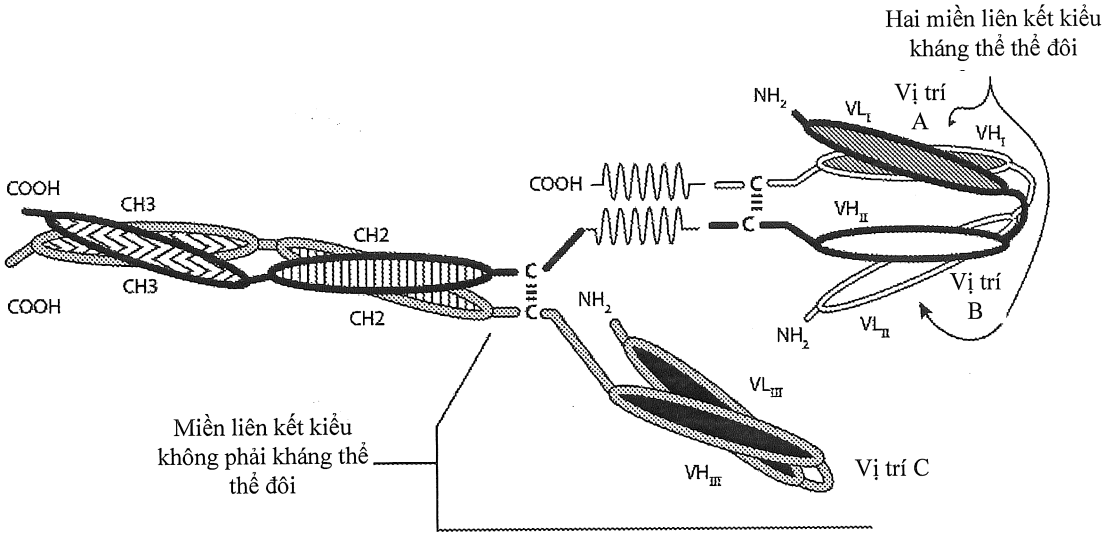

Hai miền liên kết kiểu
kháng thể thể đôi
Vị trí
A
NH2
VLI
VHI
COOH
CH3
COOH
VHII
CH2
CH3
COOH
CH2
Vị trí
B
NH2
NH2
VLII
VLIII
Miền liên kết kiểu
không phải kháng thể
thể đôi
VHIII
Vị trí C

**Fig. 6D**

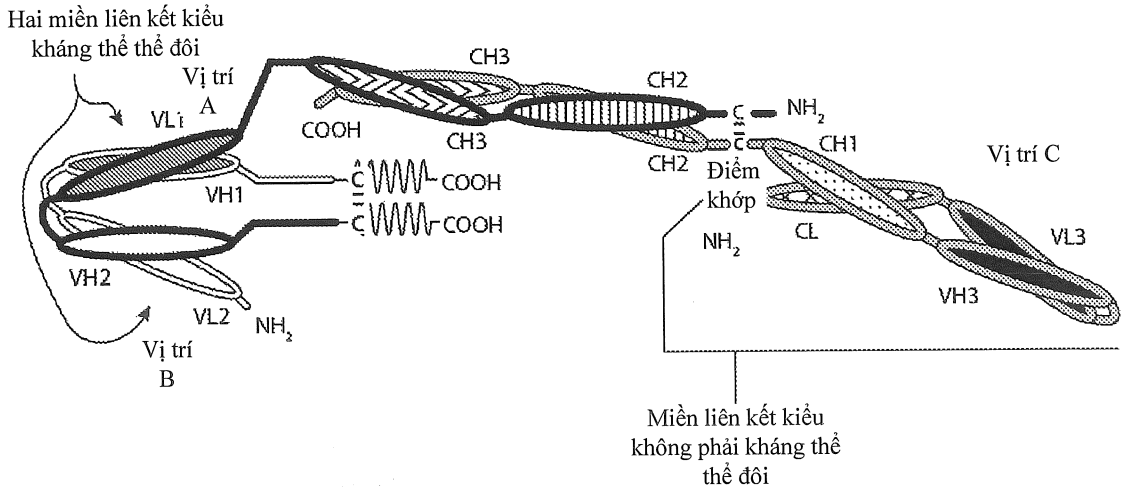

Hai miền liên kết kiểu
kháng thể thể đôi
Vị trí
A
VL1
CH3
CH2
NH2
COOH
CH3
CH1
Vị trí C
CH2
Điểm
khớp
VH1
COOH
COOH
NH2
CL
VL3
VH2
VH3
VL2
NH2
Vị trí
B
Miền liên kết kiểu
không phải kháng thể
thể đôi

**Fig. 6E**

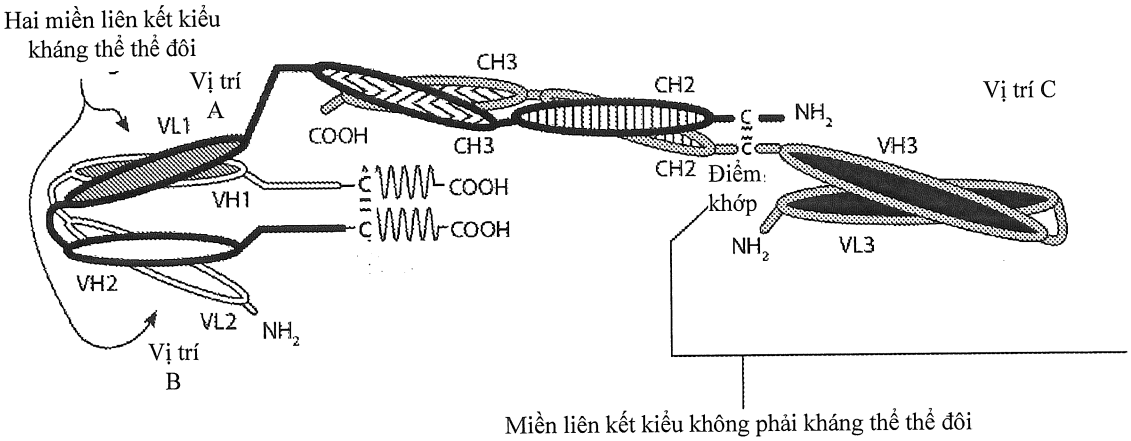

Hai miền liên kết kiểu
kháng thể thể đôi
Vị trí
A
CH3
CH2
Vị trí C
VL1
NH2
COOH
CH3
VH3
CH2
Điểm
khớp
VH1
COOH
COOH
NH2
VL3
VH2
VL2
NH2
Vị trí
B
Miền liên kết kiểu không phải kháng thể thể đôi

**Fig. 6F**

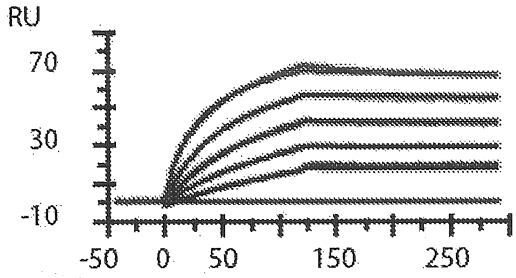



Fig. 7A

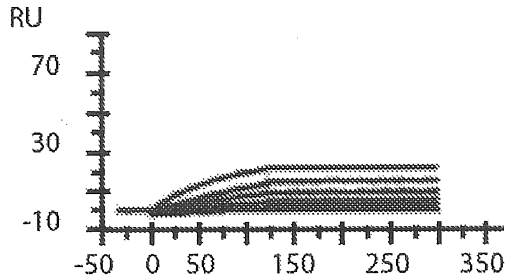



Fig. 7B

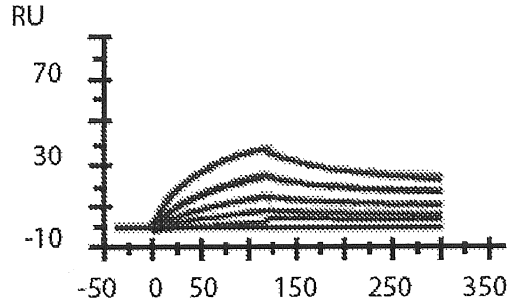



Fig. 7C

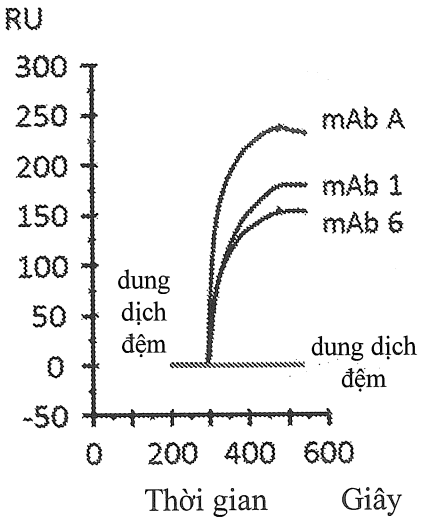



**Fig. 8A**

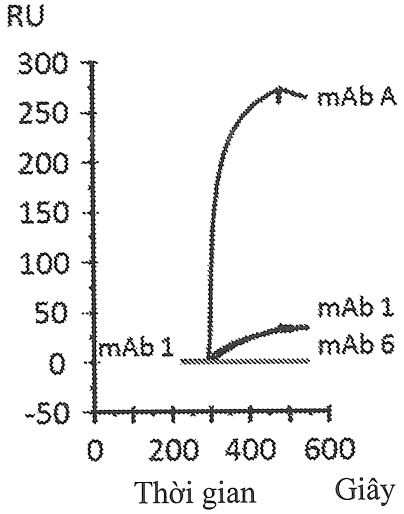



**Fig. 8B**

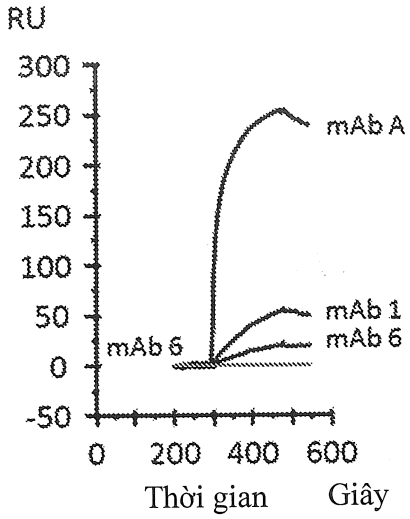



**Fig. 8C**

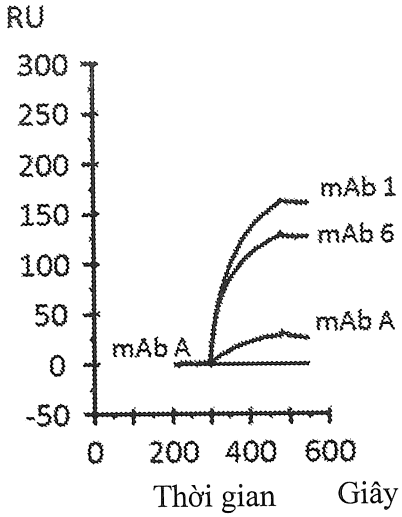



**Fig. 8D**

15/26

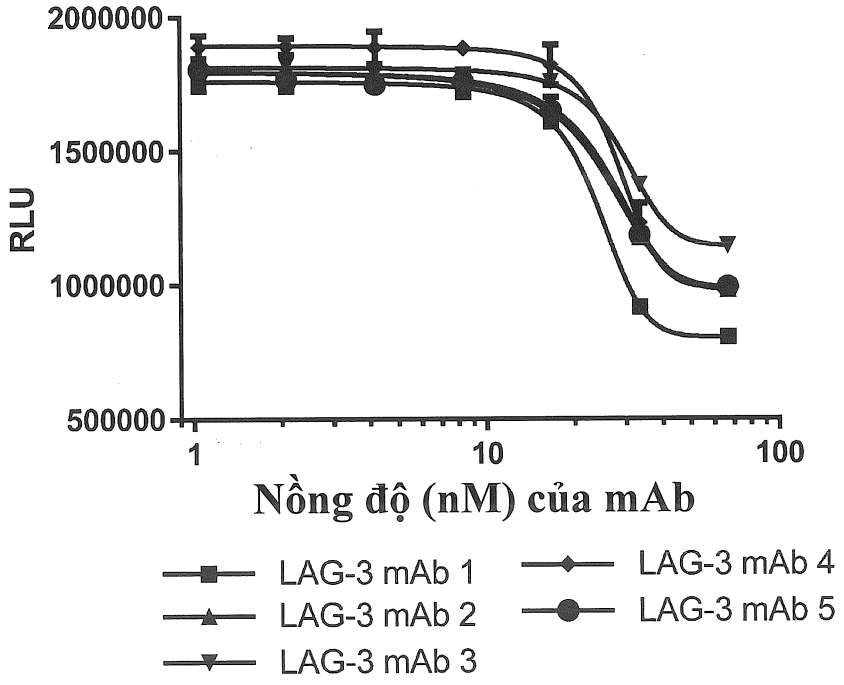



Fig. 9A

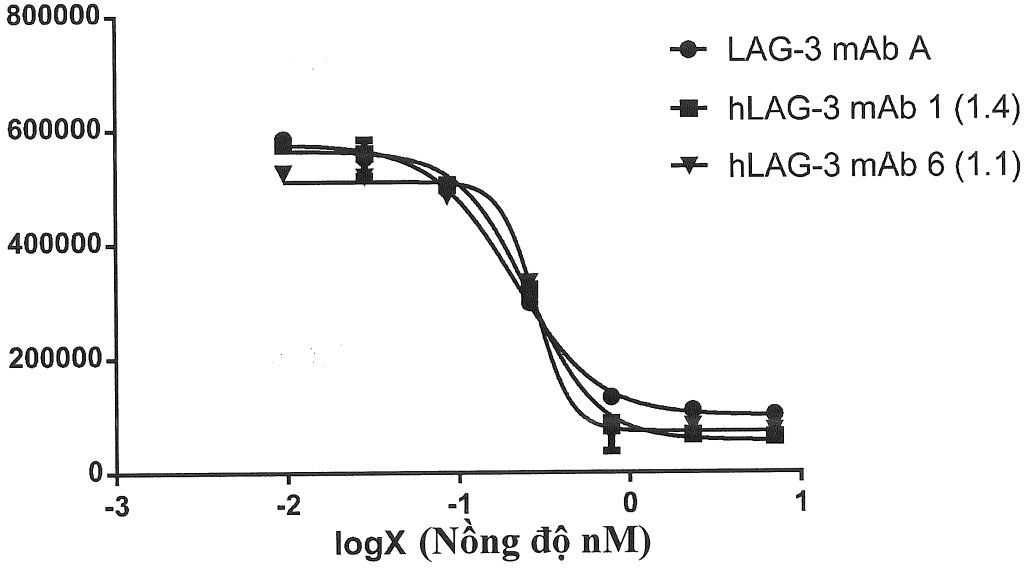



Fig. 9B

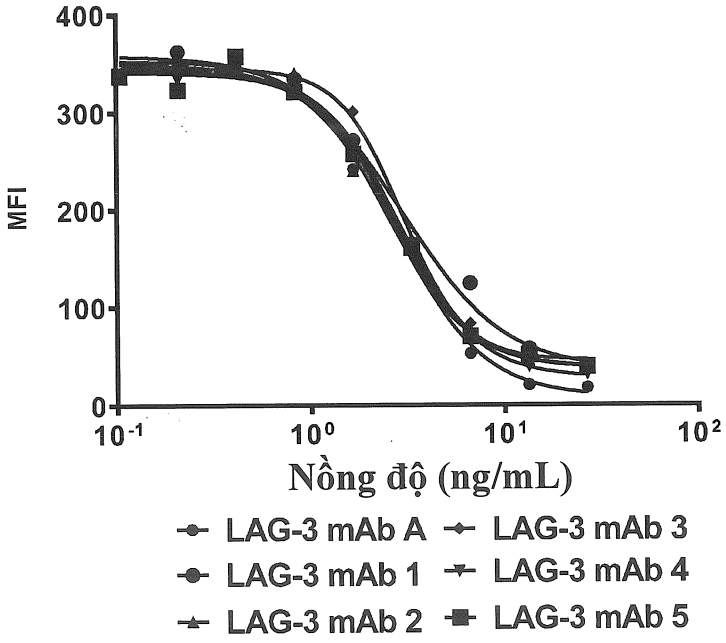



Fig. 10A

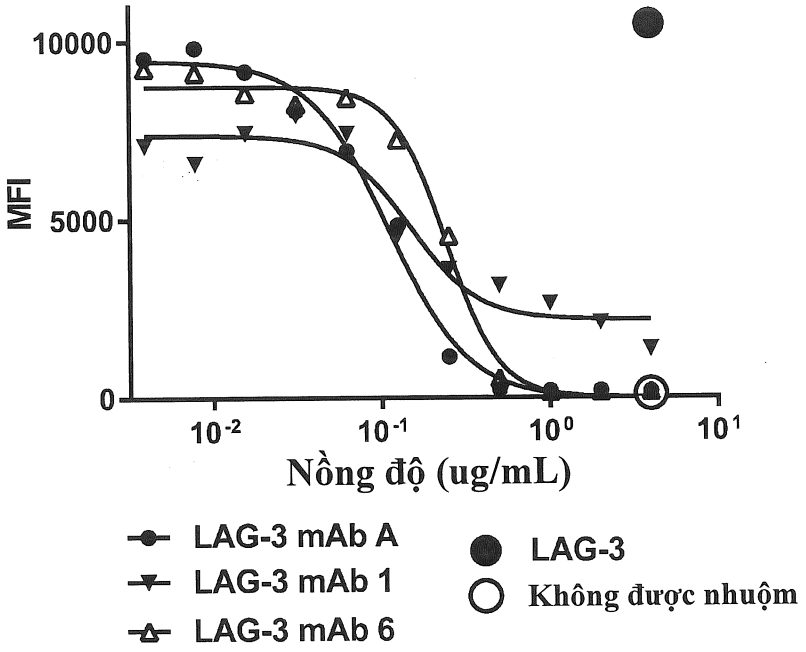



Fig. 10B

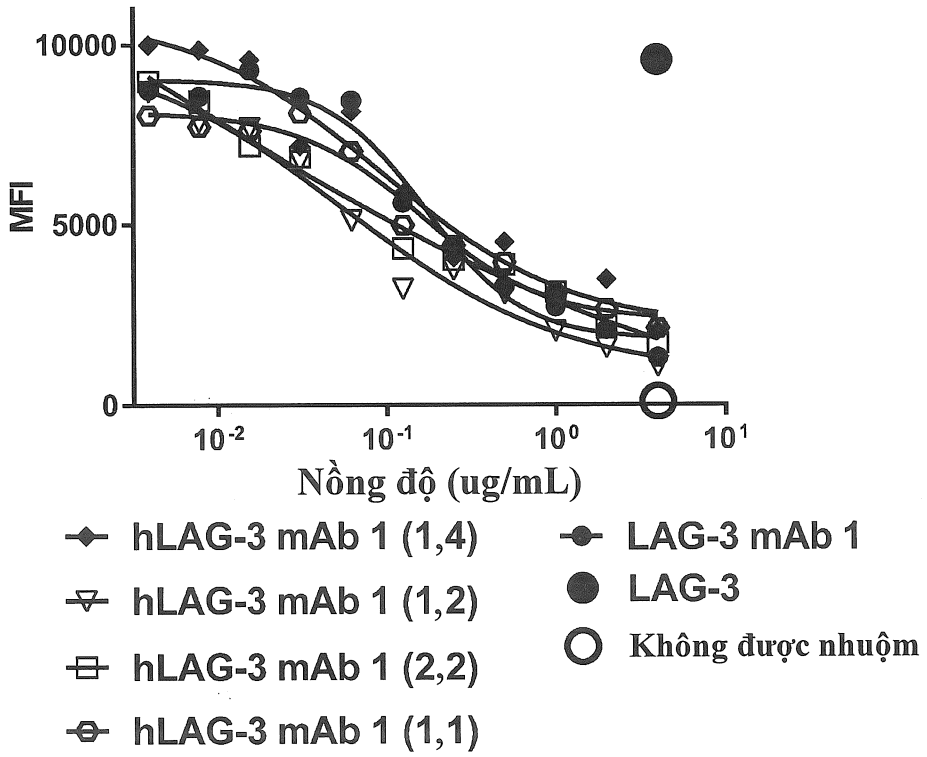

10000
5000
0
MFI
$10^{-2}$
$10^{-1}$
$10^{0}$
$10^{1}$
Nồng độ (ug/mL)
hLAG-3 mAb 1 (1,4)
hLAG-3 mAb 1 (1,2)
hLAG-3 mAb 1 (2,2)
hLAG-3 mAb 1 (1,1)
LAG-3 mAb 1
LAG-3
Không được nhuộm

**Fig. 10C**

**Fig. 11A** **Không được kích thích (D:58468)**

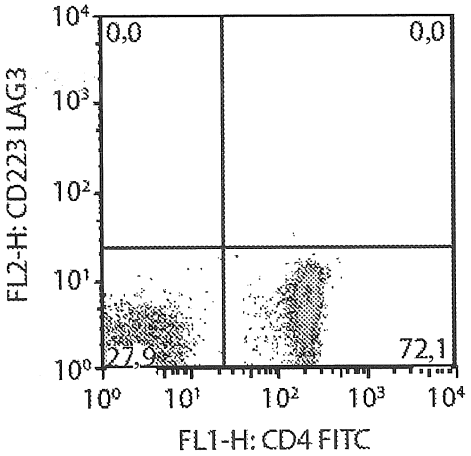



**Fig. 11B** **Được kích thích (ngày 11, D:58468)**

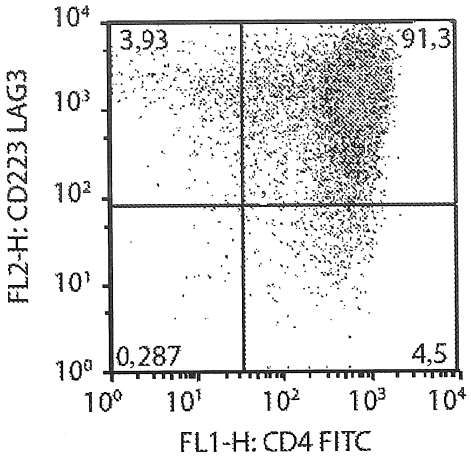
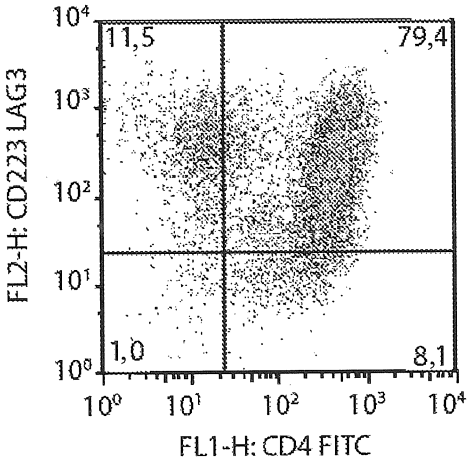



**Fig. 11C** **Được kích thích (ngày 14, D:43530)**



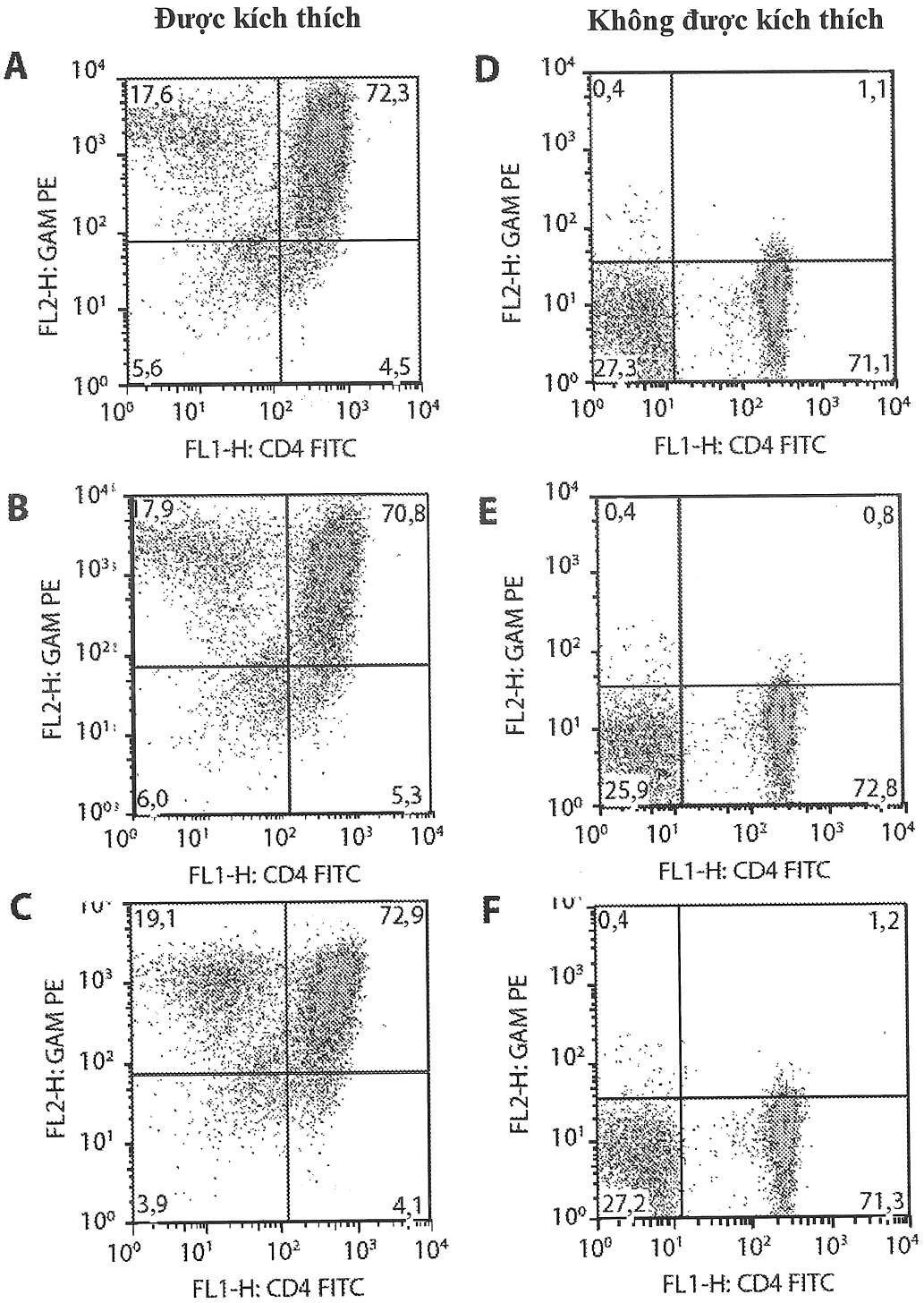

Được kích thích
Không được kích thích
A
17,6
72,3
5,6
4,5
B
17,9
70,8
6,0
5,3
C
19,1
72,9
3,9
4,1
D
0,4
1,1
27,3
71,1
E
0,4
0,8
25,9
72,8
F
0,4
1,2
27,2
71,3
FL2-H: GAM PE
FL1-H: CD4 FITC

**Fig. 12**

**Được kích thích (D:58468)** **Không được kích thích (D:43530)**

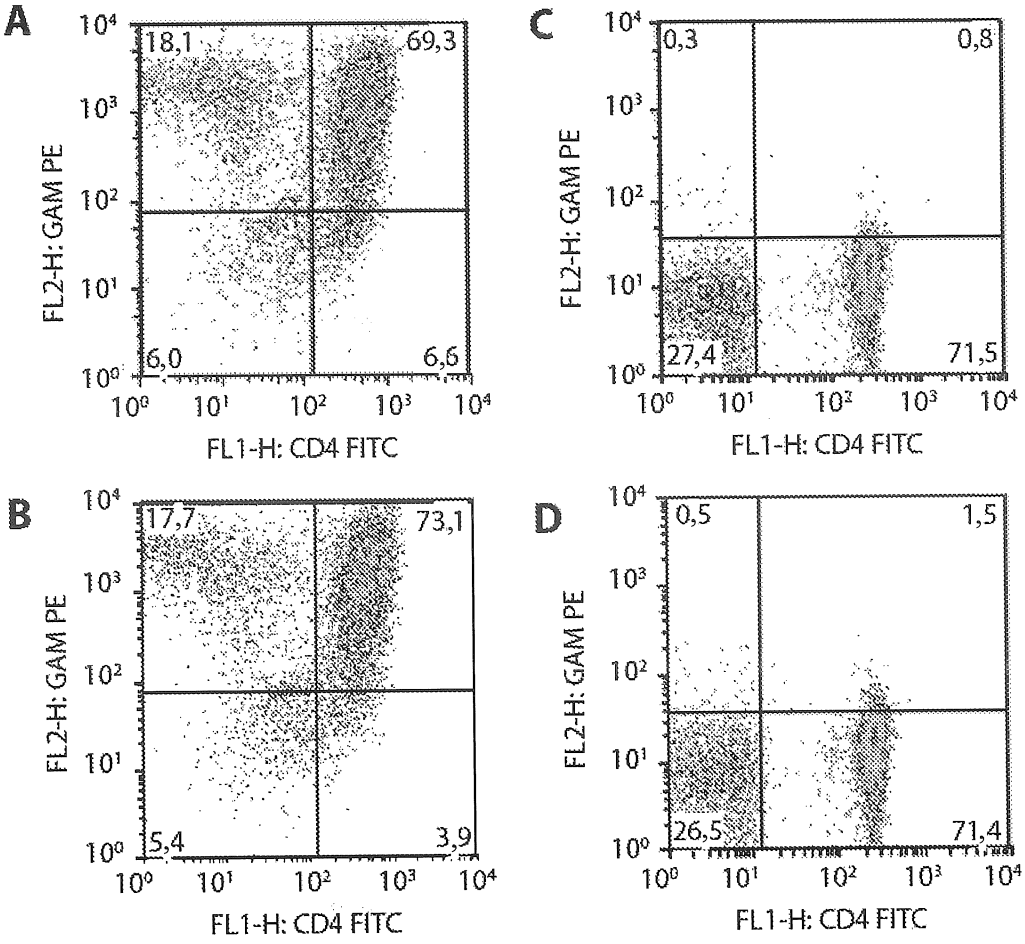



**Fig. 13**

D:34765

48 giờ sau lần đầu

5 ngày sau lần thứ hai

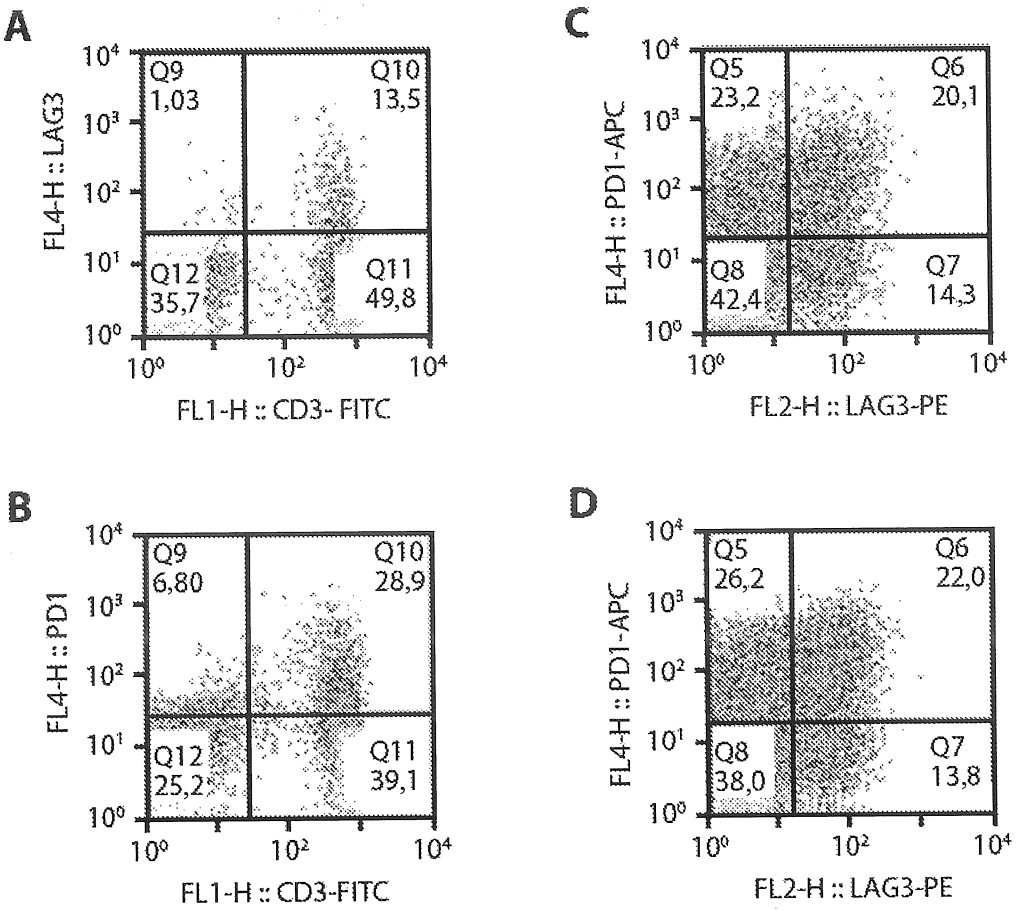



**Fig. 14**

D:53724

48 giờ sau lần đầu

5 ngày sau lần thứ hai

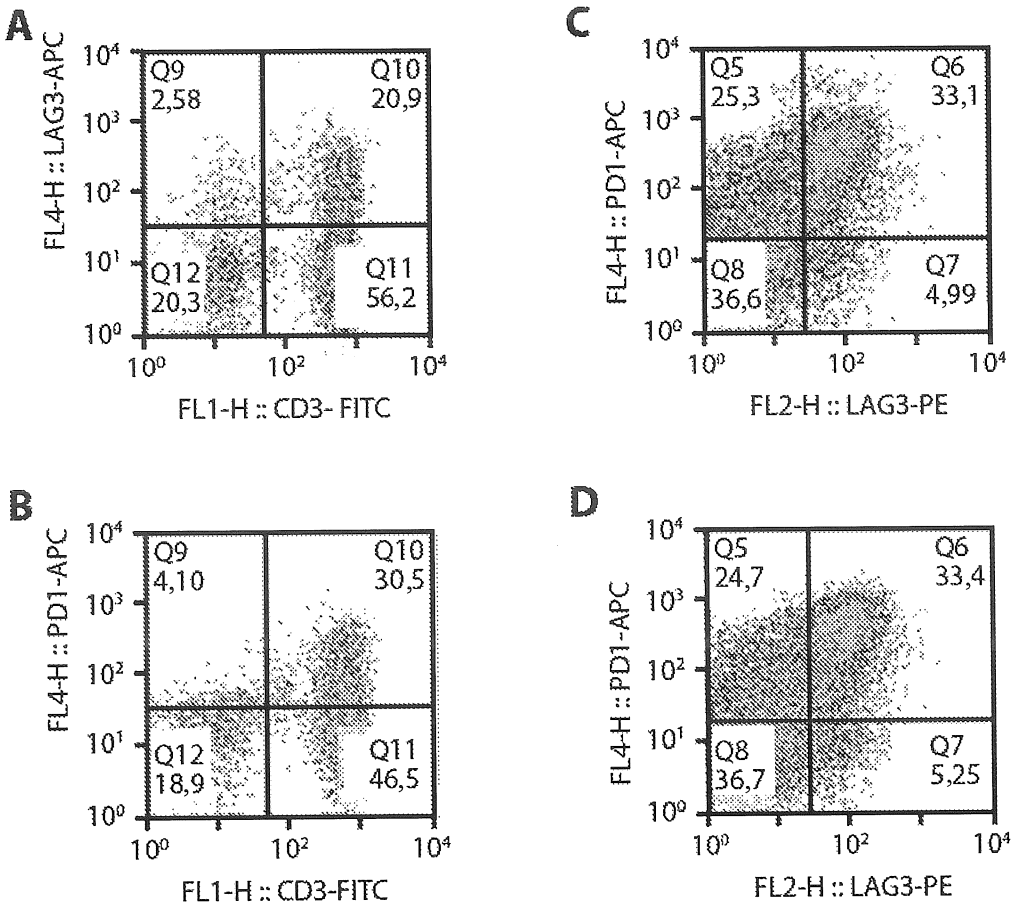



**Fig. 15**

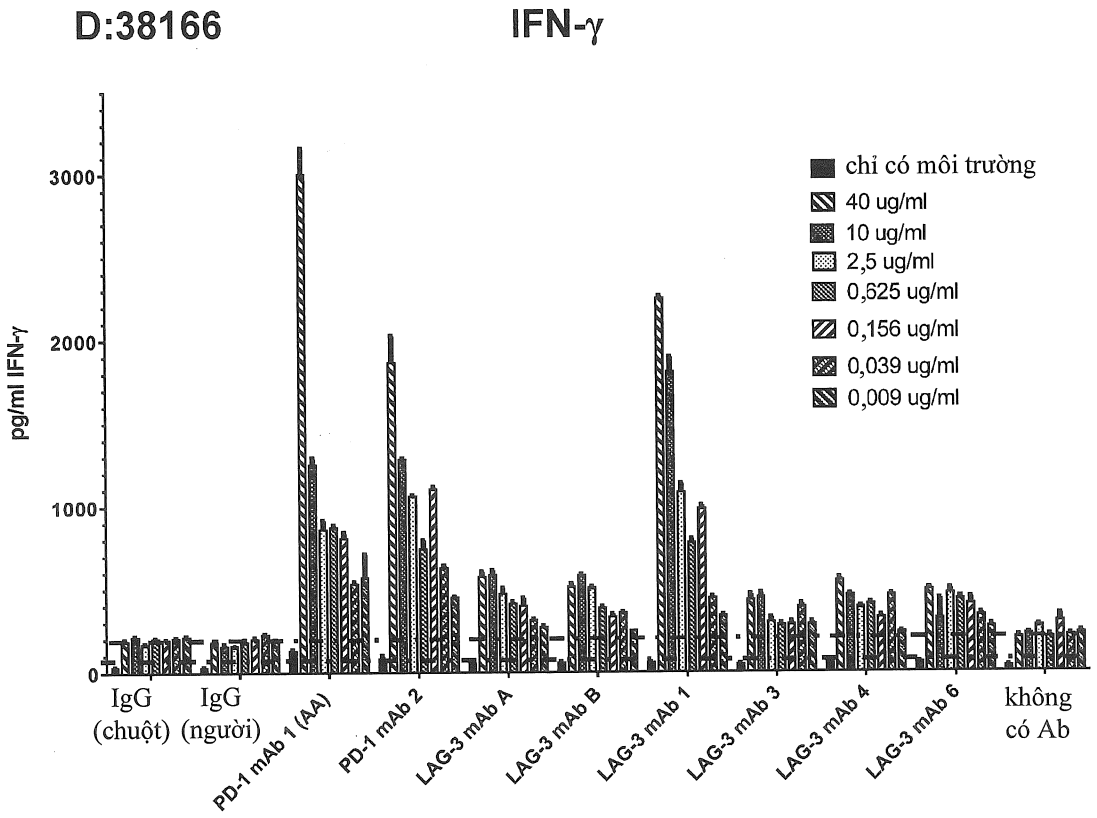

D:38166
IFN-γ
pg/ml IFN-γ
3000
2000
1000
0
chỉ có môi trường
40 ug/ml
10 ug/ml
2,5 ug/ml
0,625 ug/ml
0,156 ug/ml
0,039 ug/ml
0,009 ug/ml
IgG (chuột)
IgG (người)
PD-1 mAb 1 (AA)
PD-1 mAb 2
LAG-3 mAb A
LAG-3 mAb B
LAG-3 mAb 1
LAG-3 mAb 3
LAG-3 mAb 4
LAG-3 mAb 6
không có Ab

**Fig. 16A**

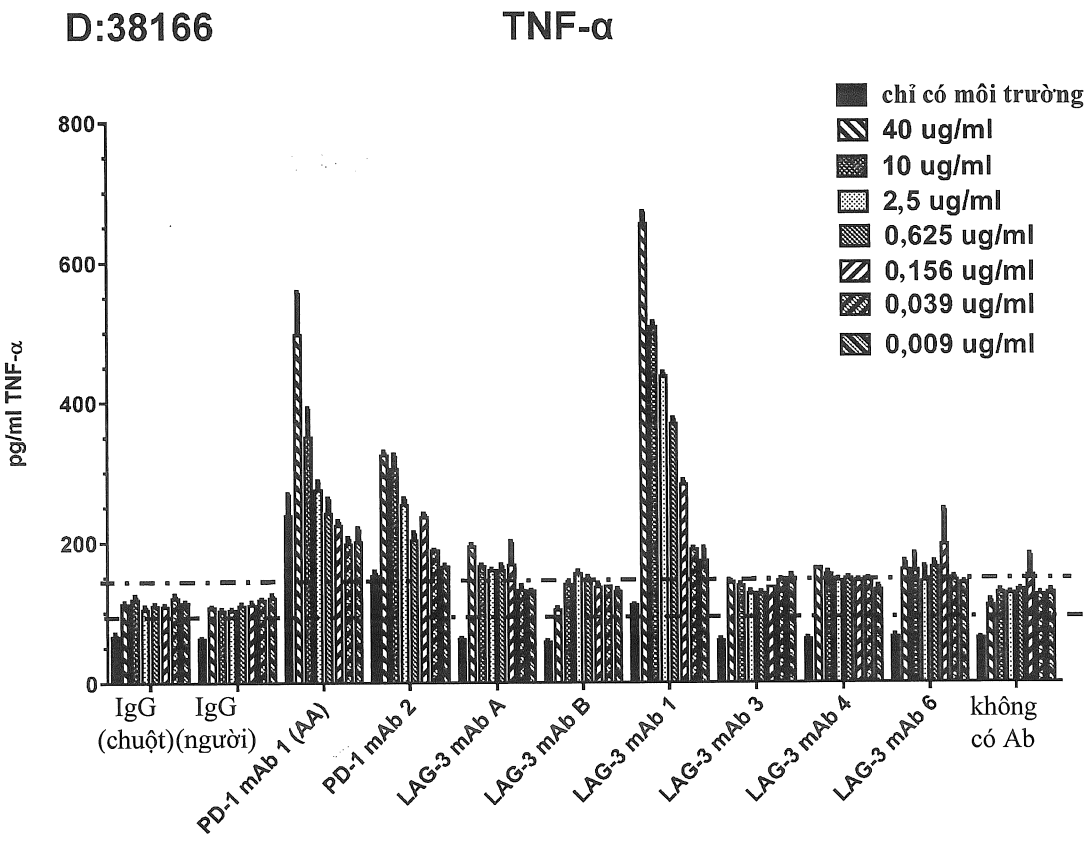

D:38166
TNF-α
chỉ có môi trường
40 ug/ml
10 ug/ml
2,5 ug/ml
0,625 ug/ml
0,156 ug/ml
0,039 ug/ml
0,009 ug/ml
pg/ml TNF-α
800
600
400
200
0
IgG (chuột)
IgG (người)
PD-1 mAb 1 (AA)
PD-1 mAb 2
LAG-3 mAb A
LAG-3 mAb B
LAG-3 mAb 1
LAG-3 mAb 3
LAG-3 mAb 4
LAG-3 mAb 6
không có Ab

**Fig. 16B**

D:58108

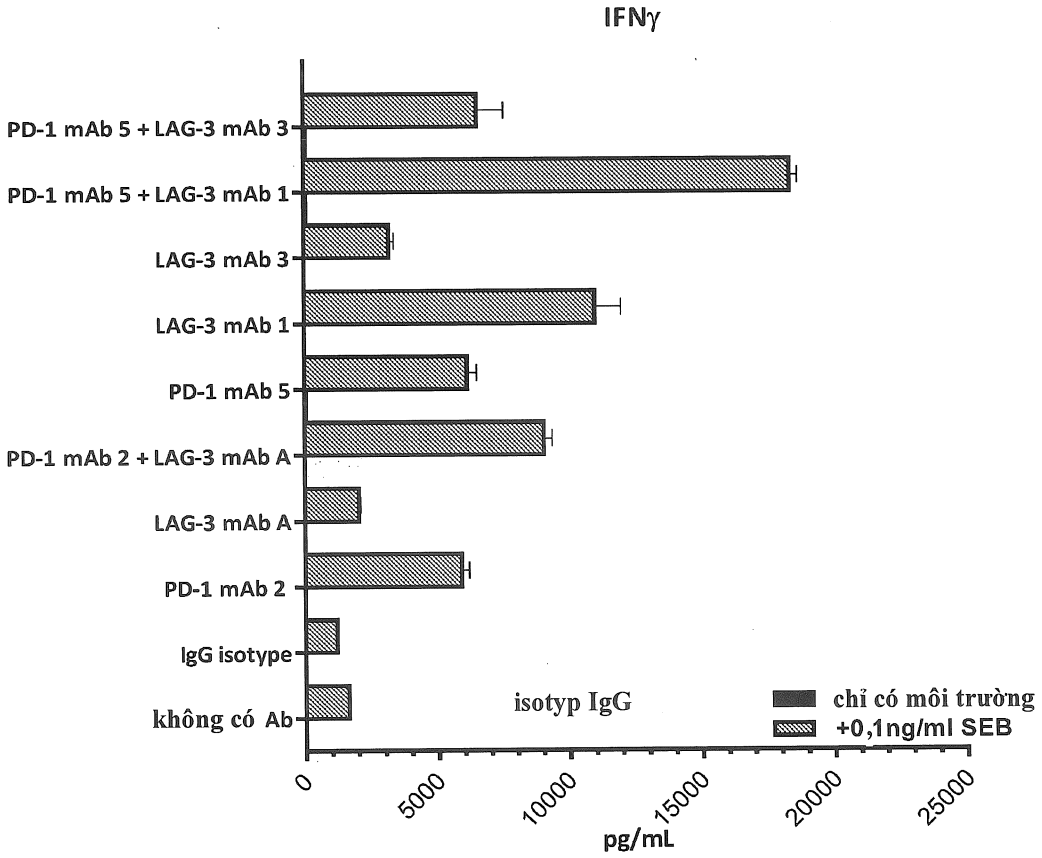



**Fig. 17**

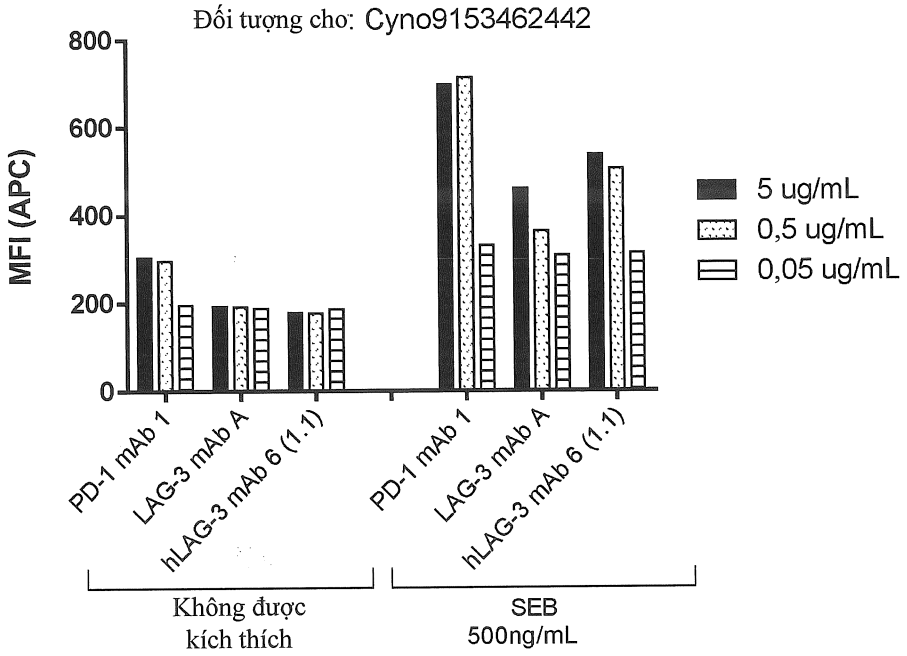



**Fig. 18A**

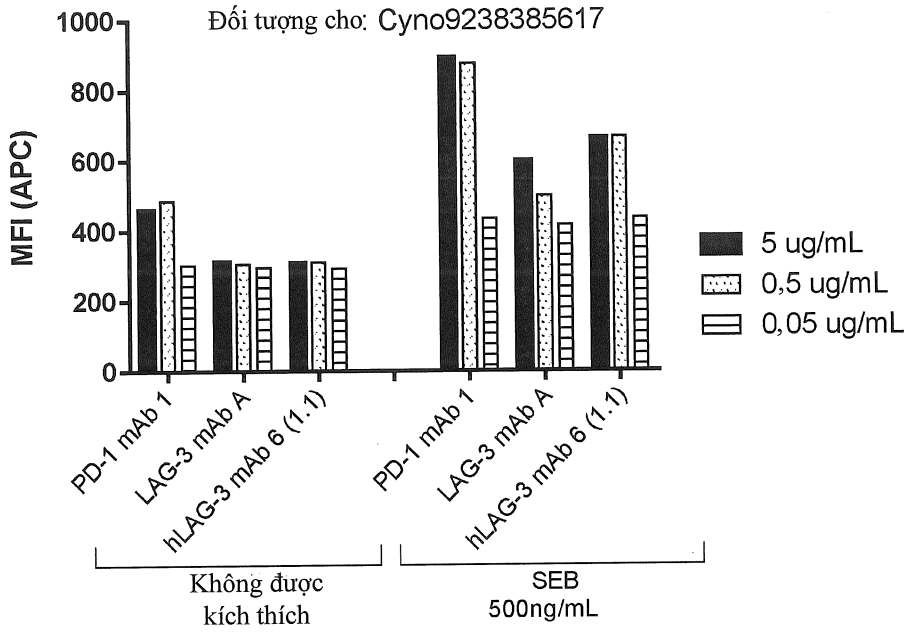



**Fig. 18B**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MacroGenics, Inc.
La Motte-Mohs, Ross
Shah, Kalpana
Smith, Douglas H.
Johnson, Leslie
Moore, Paul
Bonvini, Ezio
Koenig, Scott

<120> Phân tử liên kết gen hoạt hóa tế bào lympho 3 (LAG-3) và dược phẩm chứa phân tử này

<130> 1301.0121PCT

<150> US 62/255,094
<151> 2015-11-13

<150> US 62/172,277
<151> 2015-06-08

<160> 140

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Vùng Fc của IgG1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là Lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 1

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 2
<211> 216
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(216)
<223> Vùng Fc của IgG2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (216)..(216)
<223> Xaa216 là Lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 2

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 3
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> IgG3 Fc

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là Lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 4
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Vùng Fc của IgG4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là Lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 4

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 5
<211> 525

<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(525)
<223> LAG-3

<400> 5

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
325 330 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala

385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
405 410 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
435 440 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
515 520 525

<210> 6
<211> 120
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> LAG-3 mAb 1 VH

<400> 6

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Val Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Gly Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ile Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 360
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 1 VH

<400> 7
cagatccagt tggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc
60

tcctgcaagg cttctgggta taccttcaga aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct
120

ccaggaaagg ttttaaagtg gatgggctgg ataaacacct acactggaga gtcaacatat
180

gctgatgact tcgagggacg gtttgccttc tctttgggaa cctctgccag cactgcctat
240

ttgcagatca acatcctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagaatcc
300

ctctatgatt actattctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca
360

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> LAG-3 mAb 1 VH CDR 1

<400> 8

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> LAG-3 mAb 1 VH CDR2

<400> 9

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> LAG-3 mAb 1 VH CDR3

<400> 10

Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> LAG-3 mAb 1 VL

<400> 11

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 336
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 1 VL

<400> 12
gatgttgtgg tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc
60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta catagtgatg gaaagacata tttgaattgg
120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccagag cgcctaatct atctggtgtc tgaactggac
180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc
240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg
300

tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa
336

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> LAG-3 mAb 1 VL CDR1

<400> 13

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 1 VL CDR2

<400> 14

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> LAG-3 mAb 1 VL CDR3

<400> 15

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VH1

<400> 16

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucelotit mã hóa hLAG-3 mAb 1 VH1

<400> 17

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Thr Cys
1 5 10 15

Ala Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr
20 25 30

Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys
35 40 45

Thr Cys Cys Gly Thr Gly Ala Ala Ala Gly Thr Gly Thr Cys Cys Thr
50 55 60

Gly Thr Ala Ala Gly Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Thr Ala
65 70 75 80

Thr Ala Cys Gly Thr Thr Cys Ala Cys Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr
85 90 95

Gly Gly Thr Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Cys
100 105 110

Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala
115 120 125

Gly Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Ala Thr Ala Cys Thr Thr
145 150 155 160

Ala Thr Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Thr Ala Cys
165 170 175

Thr Thr Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Gly Ala Thr Thr Thr Cys
180 185 190

Gly Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Ala Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr
195 200 205

Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Ala Gly
210 215 220

Cys Gly Cys Thr Ala Gly Thr Ala Cys Cys Gly Cys Thr Thr Ala Thr
225 230 235 240

Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Thr Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys
245 250 255

Thr Cys Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys
260 265 270

Ala Gly Cys Thr Gly Thr Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Gly Thr
275 280 285

Gly Cys Cys Cys Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly Thr
290 295 300

Ala Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala Thr Ala Gly Cys Ala Thr
305 310 315 320

Gly Gly Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Ala
325 330 335

Gly Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Gly Thr Gly Ala Cys Ala Gly
340 345 350

Thr Gly Ala Gly Thr Thr Cys Cys
355 360

<210> 18

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

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VH2

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 1 VH2

<400> 19
caggtgcaac tggttcaatc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgcctc cgtgaaagtg
60

tcctgtaagg catctgggta tacgttcaca aattatggta tgaactgggt gcgacaggca
120

ccagggcagg gactggaatg gatggggtgg atcaatactt atacaggcga gagtacttat
180

gctgacgatt tcgagggcag atttgtcttc tccatggaca ccagcgctag taccgcttat
240

ctccagatta gttctctcaa ggcggaggac acagctgttt atttctgtgc ccgcgagagt
300

ttgtatgact actatagcat ggattactgg ggacaaggta caaccgtgac agtgagttcc
360

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL1

<400> 20

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 21
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 1 VL1

<400> 21
gatatcgtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca gcccgctagt
60

atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg gaaagaccta tttgaactgg
120

cttctgcaga aaccaggcca aagtccagag agattgatct acctcgtttc agaactcgac
180

agtggagtgc ccgatcgctt ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc
240

tcaagagtgg aggccgagga cgtcggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttccct
300

tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa
336

<210> 22
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL2

<400> 22

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 1 VL2

<400> 23
gatatcgtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca gcccgctagt
60

atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg gaaagaccta tttgaactgg
120

cttctgcaga gaccaggcca aagtccagag agattgatct acctcgtttc agaactcgac
180

agtggagtgc ccgatcgctt ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc
240

tcaagagtgg aggccgagga cgtcggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttccct
300

tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa
336

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL3

<400> 24

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 25
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 1 VL3

<400> 25
gatatcgtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca gcccgctagt
60

atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg gaaagaccta tttgaactgg
120

cttctgcaga aaccaggcca accgccagag agattgatct acctcgtttc agaactcgac
180

agtggagtgc ccgatcgctt ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc
240

tcaagagtgg aggccgagga cgtcggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttccct
300

tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa
336

<210> 26
<211> 112

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL4

<400> 26

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 27
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 1 VL4

<400> 27
gatatcgtta tgactcagac accactgtca ctgagtgtga ccccaggtca gcccgctagt
60

atttcctgta aatcatccca gtccctcctg catagcgatg caaagaccta tttgaactgg
120

cttctgcaga aaccaggcca accgccagag agattgatct acctcgtttc agaactcgac
180

agtggagtgc ccgatcgctt ctcagggtcc ggctctggga ctgattttac tctcaagatc
240

tcaagagtgg aggccgagga cgtcggggtt tactactgtt ggcagggtac ccacttccct
300

tatacatttg gcggaggcac aaaagtggag attaaa
336

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 1 VL4 CDR1

<400> 28

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 29
<211> 121
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> LAG-3 mAb 2 VH

<400> 29

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Leu Arg Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Trp His Arg Asn Tyr Phe Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 30
<211> 363
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 2 VH

<400> 30
gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc agtgaagatt
60

tcctgcaaga cttctggata cacatttact gactacaaca tacactggtt gaggcagagc
120

catggagaga gccttgagtg gattggatat atttatcctt acagtggtga tattggatac
180

aaccagaagt tcaagaacag ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac
240

atggatctcc gcagcctgac atctgaagac tctgcagtct tttactgtgc aagatggcac
300

aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactccggt cactgtctct
360

gca
363

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> LAG-3 mAb 2 VH CDR 1

<400> 31

Asp Tyr Asn Ile His
1 5

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> LAG-3 mAb 2 VH CDR2

<400> 32

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> LAG-3 mAb 2 VH CDR3

<400> 33

Trp His Arg Asn Tyr Phe Gly Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 111
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> LAG-3 mAb 2 VL

<400> 34

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Glu Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 35
<211> 333
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 2 VL

<400> 35
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg aaagttatat gaactggtac
120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatttatg ttgtatccaa tctagaatct
180

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat
240

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
300

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa
333

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> LAG-3 mAb 2 VL CDR1

<400> 36

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Glu Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 2 VL CDR2

<400> 37

Val Val Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> LAG-3 mAb 2 VL CDR3

<400> 38

Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 39
<211> 121
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> LAG-3 mAb 3 VH

<400> 39

Glu Val Arg Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Trp Ser Arg Asn Tyr Phe Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 40
<211> 363
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 3 VH

<400> 40
gaggtccggc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc agtgaagata
60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca ttcactgggt gaggcagagc
120

catggacaga gccttgagtg gattggatat atttatcctt ataatggtga tactggctac
180

aaccagaagt tcaagaccaa ggccacattg actgtagaca attcctccaa cacagcctac
240

atggaactcc gcagcctggc atctgaagac tctgcagtct attactgtac aagatggagc
300

aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct
360

gca
363

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_Feature
<222> (1)..(5)
<223> LAG-3 mAb 3 VH CDR 1

<400> 41

Asp Tyr Asn Ile His
1 5

<210> 42
<211> 17
<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_Feature
<222> (1)..(17)
<223> LAG-3 mAb 3 VH CDR2

<400> 42

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_Feature
<222> (1)..(12)
<223> LAG-3 mAb 3 VH CDR3

<400> 43

Trp Ser Arg Asn Tyr Phe Gly Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 44
<211> 111
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_Feature
<222> (1)..(111)
<223> LAG-3 mAb 3 VL

<400> 44

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 45
<211> 333
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 3 VL

<400> 45
gacattgtgc tgacccaatc tccaacttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatat gaactggtat
120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct
180

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat
240

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
300

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa
333

<210> 46
<211> 15

<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> LAG-3 mAb 3 VL CDR1

<400> 46

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 3 VL CDR2

<400> 47

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> LAG-3 mAb 3 VL CDR3

<400> 48

Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 49
<211> 121
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> LAG-3 mAb 4 VH

<400> 49

Glu Val Gln Leu His Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Ala Gly Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asn Met Asn Tyr Phe Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 50
<211> 363
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 4 VH

<400> 50
gaggtccagc ttcaccagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc agtgaagata
60

tcctgcaaga cttctggata cactttcact gactacaaca tacactgggt gaagcagagc
120

catggaaaga gccttgagtg gattggatat atttatcctt acaatggtga tgctggctac
180

aaccagaact tcaagaccaa ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac
240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatggaac
300

atgaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct
360

gcg
363

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> LAG-3 mAb 4 VH CDR 1

<400> 51

Asp Tyr Asn Ile His
1 5

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> LAG-3 mAb 4 VH CDR2

<400> 52

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Ala Gly Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> LAG-3 mAb 4 VH CDR3

<400> 53

Trp Asn Met Asn Tyr Phe Gly Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 54
<211> 111
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> LAG-3 mAb 4 VL

<400> 54

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Val Thr Tyr Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 55
<211> 333
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 4 VL

<400> 55
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg ttacttatat caactggtac
120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctttg ctgcatccaa tctagaatct
180

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat
240

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgctc
300

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa
333

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> LAG-3 mAb 4 VL CDR1

<400> 56

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

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 4 VL CDR2

<400> 57

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> LAG-3 mAb 4 VL CDR3

<400> 58

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 59
<211> 121
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> LAG-3 mAb 5 VH

<400> 59

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Asp Phe Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp His Arg Asn Tyr Phe Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 60
<211> 363
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 5 VH

<400> 60
gaggtccagc ttcagcagtc aggacctgag ctggtgaaac ctggggcctc agtgaagatt
60

tcctgcaaag cttctggata cacatttact gactacaaca tacactgggt gaagcagagc
120

cctggaaaga gccttgaatg gattggatat atttatcctt acagtggtga ttttggatac
180

aaccagaagt tcaagagcaa ggccacattg actgtagaca attcctccag cacagcctac
240

atggatctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct tttactgtgc aagatggcac
300

aggaactact ttggcccctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct
360

gca
363

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> LAG-3 mAb 5 VH CDR 1

<400> 61

Asp Tyr Asn Ile His
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> LAG-3 mAb 5 VH CDR2

<400> 62

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Asp Phe Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> LAG-3 mAb 5 VH CDR3

<400> 63

Trp His Arg Asn Tyr Phe Gly Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 64
<211> 111
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> LAG-3 mAb 5 VL

<400> 64

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Glu Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 65
<211> 333
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature

<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 5 VL

<400> 65
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg aaagttatat gaactggtac
120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatttatg ttgtttccaa tctagaatct
180

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat
240

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtagtga ggatccgctc
300

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa
333

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> LAG-3 mAb 5 VL CDR1

<400> 66

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Glu Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 5 VL CDR2

<400> 67

Val Val Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> LAG-3 mAb 5 VL CDR3

<400> 68

Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 69
<211> 118
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(118)
<223> LAG-3 mAb 6 VH

<400> 69

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

Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 354
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 6 VH

<400> 70
gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata
60

ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc
120

catggagaga gccttgagtg gattggagat attaatcctg acaatggtgt tactatctac
180

aaccagaagt ttgagggcaa ggccacactg actgtagaca agtcctccag tacagcctac
240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagaggcg
300

gattacttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca
354

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> LAG-3 mAb 6 VH CDR 1

<400> 71

Asp Tyr Asn Met Asp

1 5

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> LAG-3 mAb 6 VH CDR2

<400> 72

Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> LAG-3 mAb 6 VH CDR3

<400> 73

Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 74
<211> 107
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> LAG-3 mAb 6 VL

<400> 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 321
<212> ADN
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> misc_feature
<223> Polynucleotit mã hóa LAG-3 mAb 6 VL

<400> 75
gacattgtga tgacccagtc tcacagattc atgtccacat cagttggaga cagggtcagc
60

atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt tctgttgtag cctggtatca acagaaacca
120

ggacaatctc ctaaattact gatttttcg gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat
180

cgcttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct
240

gcagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcggtgga
300

ggcaccaagc tggaaatcaa a
321

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> LAG-3 mAb 6 VL CDR1

<400> 76

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 6 VL CDR2

<400> 77

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> LAG-3 mAb 6 VL CDR3

<400> 78

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VH-1

<400> 79

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 6 VH-1

<400> 80
caggtccagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcaag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacaaca tggactgggt ccgacaggcc
120

ccaggacagg gcctggaatg gatgggcgac atcaaccccg acaacggcgt gaccatctac
180

aaccagaaat tcgagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggtccctgcg gagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagaggcc
300

gactacttct acttcgacta ctggggccag ggcaccaccc tgaccgtgtc ctcc
354

<210> 81
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VH-2

<400> 81

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

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

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

Ser Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 354
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 6 VH-2

<400> 82
gaggtccagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtcaagc ctggcggcag cctgagactg
60

agctgcgctg ccagcggctt caccttcagc gactacaaca tggactgggt ccgacaggcc
120

cctggcaagg gcctggaatg ggtgtccgac atcaaccccg acaacggcgt gaccatctac
180

aaccagaagt tcgagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac
240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagaggcc
300

gactacttct acttcgacta ctggggccag ggcaccaccc tgaccgtgtc ctcc
354

<210> 83
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VL-1

<400> 83

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 84
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 6 VL-1

<400> 84
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
60

atcacctgtc gggccagcca ggatgtgtcc agcgtggtgg cctggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacacagg cgtgcccagc
180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag cactacagca ccccctggac cttcggcgga
300

ggcaccaagc tggaaatcaa g
321

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VL-2

<400> 85

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hLAG-3 mAb 6 VL-2

<400> 86
gacatcgtga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
60

atcacctgtc gggccagcca ggatgtgtcc agcgtggtgg cctggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacacagg cgtgcccgat
180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc
240

gaggacatcg ccgtttacta ctgccagcag cactacagca ccccctggac cttcggcgga
300

ggcaccaagc tggaaatcaa g
321

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hLAG-3 mAb 6 VL-1/VL-2 CDRL1

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
1 5 10

<210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết 1

<400> 88

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết Cys 2

<400> 89

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 90
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết ABD

<400> 90

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 91
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết

<400> 91

Leu Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết

<400> 92

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết

<400> 93

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 94
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tác nhân liên kết

<400> 94

Leu Glu Pro Lys Ser Ser
1 5

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết

<400> 95

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền kích thích heterodime

<400> 96

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 97
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền kích thích heterodime

<400> 97

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 98
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền kích thích heterodime

<400> 98

Ala Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

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

<220>
<223> Miền kích thích heterodime

<400> 99

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 100
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền kích thích heterodime

<400> 100

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 101
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> E-Coil

<400> 101

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 102
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> K-Coil

<400> 102

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 103
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vòng xoắn E được cải biến

<400> 103

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 104
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> vòng xoắn K được cải biến

<400> 104

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 105
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ABD

<400> 105

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 106
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> deimm ABD

<400> 106

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 107
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> deimm ABD

<400> 107

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 108
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> deimm ABD

<400> 108

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết khớp

<400> 109

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 110
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết

<400> 110

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 111
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết Cys

<400> 111

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

<210> 112
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết

<400> 112

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 113
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết

<400> 113

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 114
<211> 15

<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> Điểm khớp IgG1

<400> 114

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 115
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> Điểm khớp IgG2

<400> 115

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 116
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> Điểm khớp IgG4

<400> 116

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> Điểm khớp IgG4 S228P)

<400> 117

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 118
<211> 107
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> LC kapa

<400> 118

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 119

<211> 104
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(104)
<223> LC lamda

<400> 119

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 120
<211> 98
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> IgG1 CH1

<400> 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val

<210> 121
<211> 98
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> IgG2 CH1

<400> 121

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val

<210> 122
<211> 98
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> IgG4 CH1

<400> 122

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 123
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> IgG1 (AA)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 123

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 124
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> IgG1 Fc (AA/YTE)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 124

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 125
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> IgG4 Fc (YTE)

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 125

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 126
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Miền Fc phần khóa

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 126

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 127
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Fc ổ

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 127

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 128
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Chỏm Fc của IgG1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> Cả Xaa4(X1) và Xaa5(X2) đều là L (kiểu dại), hoặc đều là A (liền kết FcR giảm)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(26)
<223> Xaa22(X3), Xaa24(X4), và Xaa26(X5) lần lượt là M, S và T (kiểu dại), hoặc Y, T và E (thời gian bán thải kéo dài)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (136)..(138)
<223> Xaa136(X6), và Xaa138(X7) lần lượt là T và L (kiểu dại) hoặc W và L (phần khóa), hoặc là S và A (phần ổ)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (177)..(177)
<223> Xaa177(X8) là Y (kiểu dại) khi Xaa136(X6) là T và Xaa138(X7) là L; Xaa177(X8) là Y (phần khóa) khi Xaa136(X6) là W, và Xaa138(X7) là L, và Xaa177(X8) là V (phần ổ) khi Xaa136(X6) và Xaa138(X7), lần lượt, là S và A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (204)..(205)
<223> Xaa204(X9) và Xaa205(X10) lần lượt là N và H (kiểu dại), hoặc là N và R (không có liên kết protein A), hoặc là A và K (không liên kết protein A)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217(X11) là K hoặc không có mặt

<400> 128

Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Xaa Cys Xaa Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Xaa Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Xaa Xaa Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 129
<211> 120
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(120)
<223> LAG-3 mAb A VH

<400> 129

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 130
<211> 107
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> LAG-3 mAb A VL

<400> 130

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 131
<211> 113
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> PD-1 mAb 1 VH

<400> 131

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

<210> 132
<211> 107
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> PD-1 mAb 1 VL

<400> 132

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
100 105

<210> 133
<211> 120
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 133

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
115 120

<210> 134
<211> 111
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> PD-1 mAb 2 VL

<400> 134

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
100 105 110

<210> 135
<211> 121
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> PD-1 mAb 3 VH

<400> 135

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

Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 136
<211> 111
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> PD-1 mAb 3 VL

<400> 136

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 137
<211> 117
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(117)
<223> PD-1 mAb 4 VH

<400> 137

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 138
<211> 106
<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> PD-1 mAb 4 VL

<400> 138

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 139
<211> 330
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(330)
<223> Miền hằng định hoàn toàn IgG1 (AA)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (330)..(330)
<223> Xaa330 là lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 139

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
325 330

<210> 140
<211> 327
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(327)
<223> Vùng hằng định hoàn toàn IgG4 (P)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (327)..(327)
<223> Xaa327 là lysin (K) hoặc không có mặt

<400> 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
325