



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁸ C07K 16/00; A61K 39/395; C07K 16/28; A61K 39/00; A61K 45/06 (13) B



1-0040226

- (21) 1-2018-01580 (22) 07/10/2016
(86) PCT/US2016/056156 07/10/2016 (87) WO 2017/062888 13/04/2017
(30) 62/239,524 09/10/2015 US; 62/257,791 20/11/2015 US; 62/315,119 30/03/2016 US;
62/359,921 08/07/2016 US; 62/365,006 21/07/2016 US
(45) 25/06/2024 435 (43) 25/12/2018 369A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591-6707, United States of
America
(72) Erica ULLMAN (US); Aynur HERMANN (US); Ella IOFFE (US); Elena BUROVA
(US); Gavin THURSTON (US).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN CỦA
GEN 3 HOẠT HÓA TẾ BÀO LYMPHO (LAG3) CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể mà gắn kết với protein của gen 3 hoạt hóa tế bào lympho (LAG3) đồng ức chế tế bào T và dược phẩm chứa kháng thể này. Theo các phương án khác nhau của sáng chế, kháng thể này là kháng thể đầy đủ của người mà gắn kết đặc hiệu với LAG3. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế là hữu ích để ức chế hoặc làm trung hòa hoạt tính LAG3, do đó tạo ra phương tiện điều trị bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với gen-3 hoạt hoá tế bào lympho (lymphocyte activation gene-3-LAG3) của thụ thể điều biến miễn dịch, và phương pháp điều trị và chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phân tử đồng kích thích và đồng ức chế tế bào T (được gọi chung là các phân tử đồng truyền tín hiệu) đóng vai trò quyết định trong việc điều hòa sự hoạt hoá, sự biệt hoá nhóm phụ, chức năng phản ứng lại kích thích và sự sống của tế bào T (Chen và cộng sự 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242). Theo sự nhận biết của phức hợp peptit-MHC có cùng nguồn gốc đối với tế bào trình diện kháng nguyên bởi thụ thể tế bào T, các thụ thể đồng truyền tín hiệu này đồng khu biệt với các thụ thể tế bào T ở khớp thần kinh miễn dịch, mà ở đó chúng hiệp đồng với việc truyền tín hiệu TCR để thúc đẩy hoặc ức chế sự hoạt hoá và chức năng của tế bào T (Flies và cộng sự 2011, Yale J. Biol. Med. 84: 409-421). Đáp ứng miễn dịch sau cùng được điều hòa bởi mức cân bằng giữa các tín hiệu đồng kích thích và đồng ức chế (“điểm kiểm tra miễn dịch”) (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264). Gen-3 hoạt hoá tế bào lympho (LAG3) có chức năng làm một ‘điểm kiểm tra miễn dịch’ như vậy trong việc làm trung gian dung nạp tế bào T ngoại vi.

LAG3 (còn được gọi là CD223) là thụ thể protein xuyên màng của axit amin 503 được biểu hiện trên tế bào T CD4 và CD8 được hoạt hoá, tế bào T $\gamma\delta$, tế bào T giết tự nhiên, tế bào B, tế bào giết tự nhiên, tế bào có tua dạng tương bào và tế bào T điều hòa. LAG3 là thành viên của liên họ globulin miễn dịch (immunoglobulin-Ig). Chức năng cơ bản của LAG3 là làm giảm đáp ứng miễn dịch. LAG3 gắn kết với các phân tử MHC nhóm II dẫn đến sự phân phối tín hiệu âm tính cho tế bào biểu hiện LAG3 và điều hòa giảm các đáp ứng tế bào T CD4 và CD8 phụ thuộc kháng nguyên. LAG3 điều hòa âm tính khả năng tế bào T tăng sinh, tạo ra các xytokin và ly giải các tế bào đích, được gọi là ‘làm kiệtlảm kiệt’ tế bào T. LAG3 cũng được thông báo đóng

vai trò trong việc làm tăng cường chức năng tế bào T điều hòa (T regulatory-Treg) (Pardoll 2012, Nature Reviews Cancer 12: 252-264).

Do LAG3 đóng vai trò quan trọng trong tính sinh miễn dịch khối u và tính sinh miễn dịch lây nhiễm, nó là đích lý tưởng cho liệu pháp miễn dịch. Việc phong bế LAG3 bằng các chất đối kháng, bao gồm các kháng thể đơn dòng, đã được nghiên cứu trong các phương pháp điều trị bệnh ung thư và các lây nhiễm virus mạn tính (Turnis và cộng sự 2015, Eur. J. Immunol. 45: 1892-1905).

Đã biết các kháng thể đơn dòng kháng LAG3 trong lĩnh vực này và đã được mô tả, ví dụ, trong các patent Mỹ/công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 5976877, 6143273, 6197524, 8551481, 20110070238, 20110150892, 20130095114, 20140093511, 20140127226, 20140286935, và trong các công bố đơn quốc tế số WO95/30750, WO97/03695, WO98/58059, WO2004/078928, WO2008/132601, WO2010/019570, WO2014/008218, các patent châu Âu số EP0510079B1, EP0758383B1, EP0843557B1, EP0977856B1, EP1897548B2, EP2142210A1, và EP2320940B1.

Khi phát triển liệu pháp miễn dịch dùng để điều trị cho sự sống của con người, vẫn có nhu cầu về các kháng thể biểu lộ các đặc tính như tính sinh miễn dịch thấp, các tham số động học gắn kết thích hợp, khả năng phản ứng chéo với đích khi, hoạt tính *in vitro* thích hợp và/hoặc hoạt tính *in vivo* thích hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết LAG3. Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích, không kể các tác dụng khác, để nhắm trúng đích tế bào miễn dịch biểu hiện LAG3, và để điều biến hoạt tính LAG3. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế là hữu ích để ức chế hoặc làm trung hoà hoạt tính LAG3 và/hoặc để kích thích sự hoạt hoá tế bào T, ví dụ, trong các trường hợp mà trong đó có lợi hoặc mong muốn việc diệt qua trung gian tế bào T. Theo các phương án nhất định, các kháng thể này là hữu ích dùng để ức chế chức năng tế bào T điều hòa và/hoặc dùng để làm đảo ngược trạng thái vô cảm của tế bào T bị làm kiệt. Các kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế hoặc các phần gắn kết kháng nguyên của chúng, có thể có dưới dạng một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu, ví dụ, để điều biến đáp ứng miễn dịch và/hoặc để nhắm trúng đích các kháng

thể với kiểu tế bào đặc hiệu, như tế bào khối u hoặc tế bào nhiễm virus. Các kháng thể này là hữu ích trong điều trị bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư và lây nhiễm virus.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ có phần gắn kết kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab, F(ab')₂ hoặc scFv), và có thể được cải biến để tác động đến chức năng, ví dụ, để loại trừ chức năng phản ứng lại kích thích còn lại (Reddy và cộng sự., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). Theo các phương án nhất định, các kháng thể này có thể là đặc hiệu kép.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết đặc hiệu với LAG3. Theo các phương án nhất định, các kháng thể là kháng thể đầy đủ của người.

Các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ theo sáng chế được liệt kê trong các Bảng 1 đến 3 trong bản mô tả này. Bảng 1 đưa ra bộ định danh trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR), vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR), vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3), và vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ. Bảng 2 đưa ra các bộ định danh trình tự axit nucleic của các HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ. Bảng 3 đưa ra bộ định danh trình tự axit amin của các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ.

Sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó các kháng thể này chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của

chúng, trong đó kháng thể này chứa cặp trình tự axit amin HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1 được ghép cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó các kháng thể này chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546, và 554/562. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ trình tự trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 386/394 (ví dụ, H4sH15479P), 418/426 (ví dụ, H4sH15482P) hoặc 538/546 (ví dụ, H4sH14813N). Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng chứa HCVR và LCVR, HCVR này có trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 có không nhiều hơn năm sự thay thế axit amin, và LCVR này có trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 có không nhiều hơn năm sự thay thế axit amin. Ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng chứa HCVR và LCVR, HCVR này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 418 có không nhiều hơn năm sự thay thế axit amin, và LCVR này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 426 có không nhiều hơn năm sự thay thế axit amin. Theo phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng chứa HCVR và LCVR, HCVR này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 418 có ít nhất một sự thay thế axit amin, và LCVR này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 426 có một sự thay thế axit amin.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó các kháng thể này chứa CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR1 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít

nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR2 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR1 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR2 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này có cặp trình tự axit amin HCDR3 và LCDR3 (HCDR3/LCDR3) có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong Bảng 1 được ghép cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất

các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này có cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 392/400 (ví dụ, H4sH15479P), 424/432 (ví dụ, H4sH15482P) và 544/552 (ví dụ, H4sH14813N).

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa HCVR và LCVR, HCVR này chứa HCDR1 có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin, HCDR2 có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin, và HCDR3 có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa HCVR và LCVR, LCVR này chứa LCDR1 có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin, LCDR2 có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin, và LCDR3 có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin. Ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa HCVR và LCVR, HCVR chứa HCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 420 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 420 bởi 1 axit amin, HCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 422 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 422 bởi 1 axit amin, và HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 424 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 424 bởi 1 axit amin. Theo phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa HCVR và LCVR, LCVR chứa LCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 428 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 428 bởi 1 axit amin, LCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 430 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 430 bởi 1 axit amin, và LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 432 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 432 bởi 1 axit amin.

Sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng,

trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HC được liệt kê trong Bảng 3, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LC được liệt kê trong Bảng 3, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa cặp trình tự axit amin HC và LC (HC/LC) có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HC được liệt kê trong Bảng 3 ghép cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LC được liệt kê trong Bảng 3. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa cặp trình tự axit amin HC/LC được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 3. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HC/LC được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 577/578, 579/578, và 580/581.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa tập hợp gồm sáu CDR (nghĩa là, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 388-390-392-396-398-400 (ví dụ, H4sH15479P), 420-422-424-428-430-432 (ví dụ, H4sH15482P) và 540-542-544-548-550-552 (ví dụ, H4sH14813N).

Theo phương án có liên quan, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa tập hợp gồm sáu CDR (nghĩa là, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) được chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Ví dụ, sáng chế đề xuất

các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể này chứa tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 được chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 386/394 (ví dụ, H4sH15479P), 418/426 (ví dụ, H4sH15482P) và 538/546 (ví dụ, H4sH14813N). Đã biết các phương pháp và các kỹ thuật nhận biết các CDR trong các trình tự axit amin HCVR và LCVR trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để nhận biết các CDR trong các trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR được xác định được bộc lộ trong bản mô tả này. Các quy tắc làm ví dụ mà có thể được sử dụng để nhận biết các đường biên của các CDR bao gồm, ví dụ, xác định theo Kabat, xác định theo Chothia, và xác định theo AbM. Trong các thuật ngữ thông thường, việc xác định theo Kabat được dựa vào độ biến đổi trình tự, việc xác định theo Chothia được dựa vào vị trí của các vùng vòng lặp cấu trúc, và việc xác định theo AbM là sự dàn xếp giữa phương pháp Kabat và Chothia. Xem, ví dụ, tài liệu Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani và cộng sự, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và Martin và cộng sự, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Các cơ sở dữ liệu phổ biến cũng sẵn có để nhận biết các trình tự CDR trong kháng thể.

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 có mẫu glycosyl hoá được biến đổi. Theo một số phương án, sự biến đổi để loại bỏ các vị trí glycosyl hoá không mong muốn có thể là hữu ích, hoặc kháng thể thiếu gốc fucoza có mặt trên chuỗi oligosacarit, ví dụ, để làm tăng chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity-ADCC) (xem tài liệu Shield và cộng sự (2002) *JBC* 277:26733). Trong các ứng dụng khác, sự biến đổi quá trình galactosyl hoá có thể được thực hiện để biến đổi tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity-CDC).

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 chứa miền Fc, trong đó miền Fc chứa lớp kháng thể IgG1 hoặc IgG4 như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, miền Fc chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 569, 570, 571, 572 và 573.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà cạnh tranh để gắn kết đặc hiệu với LAG3 với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các CDR của HCVR và các CDR của LCVR, trong đó mỗi

HCVR và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự HCVR và LCVR được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể phân lập và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà phong bế sự gắn kết của LAG3 có thể gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên LAG3 dưới dạng MHC nhóm II hoặc có thể gắn kết với quyết định kháng nguyên khác trên LAG3 dưới dạng MHC nhóm II.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 từ người hoặc các loài khác. Theo các phương án nhất định, các kháng thể có thể gắn kết với LAG3 của người và/hoặc với LAG3 của khỉ.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà cạnh tranh chéo để gắn kết với LAG3 với kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các CDR của HCVR và các CDR của LCVR, trong đó mỗi HCVR và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự HCVR và LCVR được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên dưới dạng kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các CDR của HCVR và các CDR của LCVR, trong đó mỗi HCVR và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự HCVR và LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên dưới dạng kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các CDR của HCVR và các CDR của LCVR, trong đó cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 418/426.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng LAG3 mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin được chứa trong miền ngoại bào của LAG3 của người (SEQ ID NO: 588). Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3 và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (a) axit amin từ 28 đến 69 nêu trong SEQ ID NO: 588; (b) axit amin từ 28 đến 71 nêu trong SEQ ID NO: 588; (c) axit amin từ 31 đến 52 nêu trong SEQ ID NO: 588;

và (d) axit amin từ 32 đến 69 nêu trong SEQ ID NO: 588. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3 và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin nêu trong SEQ ID NO: 589, ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3 và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với ít nhất 5 axit amin, ít nhất 10 axit amin, hoặc ít nhất 20 axit amin nêu trong SEQ ID NO: 589. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3 và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 589 (tương ứng với axit amin từ 28 đến 71 nêu trong SEQ ID NO: 588).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên mà có một hoặc nhiều đặc điểm sau: (a) gắn kết đặc hiệu với LAG3 của người và/hoặc LAG3 của khỉ cynomolgus; (b) phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II; (c) phong bế sự điều hòa giảm tế bào T do LAG3 gây ra và phóng thích sự truyền tín hiệu tế bào T; và (d) ngăn chặn sự phát triển của khối u và làm tăng sự sống ở đối tượng mắc bệnh ung thư.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể gắn kết đặc hiệu với LAG3 theo cách chủ vận, nghĩa là nó có thể làm tăng cường hoặc kích thích sự gắn kết và/hoặc hoạt tính của LAG3; theo các phương án khác, kháng thể có thể gắn kết đặc hiệu với LAG3 theo cách đối kháng, nghĩa là, nó có thể phong bế LAG3 không cho gắn kết với phối tử của nó.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế là đặc hiệu kép có độ đặc hiệu gắn kết thứ nhất với LAG3 và độ đặc hiệu gắn kết thứ hai đối với quyết định kháng nguyên đích thứ hai. Quyết định kháng nguyên đích thứ hai này có thể là quyết định kháng nguyên khác trên LAG3 hoặc trên protein khác. Theo các phương án nhất định, quyết định kháng nguyên đích thứ hai có thể trên tế bào khác bao gồm tế bào T khác, tế bào B, tế bào khối u hoặc tế bào nhiễm virus.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng LAG3 hoặc các phần của nó. Ví dụ, sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được

chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR1 được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR1 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR2 được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR2 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR3 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR1 được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR1 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương

đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR2 được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR2 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR3 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá HCVR, trong đó HCVR có tập hợp gồm ba CDR (nghĩa là, HCDR1-HCDR2-HCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3 như được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá LCVR, trong đó LCVR có tập hợp gồm ba CDR (nghĩa là, LCDR1-LCDR2-LCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin LCDR1-LCDR2-LCDR3 như được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá cả HCVR và LCVR, trong đó HCVR có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1, và trong đó LCVR có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó, và trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần

như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với nó. Theo các phương án nhất định theo khía cạnh này của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hoá HCVR và LCVR, trong đó cả HCVR và LCVR đều có nguồn gốc từ cùng một kháng thể kháng LAG3 được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin chuỗi nặng được liệt kê trong Bảng 3. Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin chuỗi nhẹ được liệt kê trong Bảng 3.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá cả chuỗi nặng (HC) và chuỗi nhẹ (LC), trong đó HC có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HC được liệt kê trong Bảng 3, và trong đó LC có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LC được liệt kê trong Bảng 3.

Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polypeptit có vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng LAG3. Ví dụ, sáng chế bao gồm các vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic nêu trên, nghĩa là, phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR, LCVR và/hoặc CDR như được nêu trong Bảng 1. Sáng chế cũng đề xuất các vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polypeptit chứa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng LAG3. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic nêu trên, nghĩa là, phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ như được nêu trong Bảng 3. Cũng được chứa trong phạm vi của sáng chế là các tế bào chủ mà trong đó các vector này đã được đưa vào, cũng như các phương pháp tạo ra các kháng thể hoặc các phần của nó bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong các điều kiện cho phép tạo ra các kháng thể hoặc mảnh kháng thể, và thu gom các kháng thể và mảnh kháng thể được tạo ra theo cách như vậy.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể tái tổ hợp của người hoặc mảnh của nó mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 và chất mang dược dụng. Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề cập đến chế phẩm mà là tổ hợp của kháng thể kháng LAG3 và chất trị liệu thứ hai. Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai là chất bất kỳ mà được kết hợp có lợi với kháng thể kháng LAG3. Các chất làm ví dụ mà có

thể được kết hợp có lợi với kháng thể kháng LAG3 bao gồm, nhưng không giới hạn, các chất khác mà gắn kết và/hoặc điều biến sự truyền tín hiệu LAG3 (bao gồm các kháng thể khác hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, v.v.) và/hoặc các chất mà không gắn kết trực tiếp với LAG3 nhưng tuy nhiên điều biến sự hoạt hoá tế bào miễn dịch. Các liệu pháp kết hợp bổ sung và các đồng dược phẩm chứa kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều biến này dùng lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó của sáng chế. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng này dùng lượng có hiệu quả của kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế mà gắn kết với LAG3. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp kích thích hoặc làm tăng cường sự hoạt hoá tế bào T ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp phóng thích hoạt tính tế bào T, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc với lượng có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế sao cho hoạt tính tế bào T được phóng thích. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế tế bào T điều hòa (Treg) ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị này dùng lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, đối tượng cần điều trị này có thể mắc bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư hoặc nhiễm virus. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp phóng thích sự ức chế qua trung gian LAG3 hoạt tính của tế bào T, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc với lượng có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư hoặc nhiễm virus ở đối tượng bằng cách sử dụng kháng thể kháng LAG3 hoặc phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, trong đó phương pháp trị liệu này bao gồm bước cho đối tượng cần phương pháp trị liệu này dùng lượng có hiệu quả trị liệu của dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bất kỳ mà được cải thiện, được thuyên giảm, được ức chế hoặc được ngăn ngừa bởi sự kích thích hoặc sự ức chế

hoạt tính hoặc truyền tín hiệu LAG3. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được dùng kết hợp với chất trị liệu thứ hai cho đối tượng cần điều trị này. Chất trị liệu thứ hai có thể được chọn từ nhóm gồm có kháng thể với chất đồng ức chế tế bào T khác, kháng thể với kháng nguyên tế bào khối u, kháng thể với thụ thể tế bào T, kháng thể với quyết định kháng nguyên trên tế bào nhiễm virus, chất gây độc tế bào, dược chất kháng bệnh ung thư, dược chất kháng virus, dược chất chống viêm (ví dụ, corticosteroid), chất hoá trị liệu, liệu pháp bức xạ, chất ngăn chặn miễn dịch và dược chất hoặc liệu pháp khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu thứ hai có thể là chất mà trợ giúp làm mất tác dụng hoặc làm giảm (các) tác dụng phụ có thể có bất kỳ liên quan đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, nếu (các) tác dụng phụ này có thể xảy ra.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn chặn sự phát triển của khối u. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn chặn sự phát triển của khối u do khối u nguyên phát hoặc khối u di căn ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng cường sự sống (ví dụ, sự sống không tiến triển hoặc sự sống tổng thể) của đối tượng mắc bệnh ung thư. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư sơ cấp và/hoặc bệnh ung thư tái phát, bao gồm bệnh ung thư máu (ví dụ, khối u ác tính tế bào máu như u lympho, u tủy hoặc bệnh bạch cầu), bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng), bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ), bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận, khối u hắc tố, u trung biểu mô, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, và bệnh ung thư ruột kết. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế hoặc ngăn chặn sự phát triển của các khối u đã được xác định. Phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị này dùng được phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, kháng thể được dùng kết hợp với chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm gồm có chất ức chế gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1) (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như nivolumab hoặc REGN2810), chất ức chế phối tử gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1) (ví dụ, kháng thể kháng PD-L1), chất đối

kháng yếu tố phát triển nội mô mạch (VEGF) (ví dụ, aflibercept, bevacizumab), chất ức chế angiopoietin-2 (Ang2) (ví dụ, kháng thể kháng Ang2 như nesvacumab), chất ức chế kháng nguyên tế bào lympho T gây độc tế bào 4 (CTLA-4) (ví dụ, ipilimumab), kháng thể đặc hiệu kép CD20xCD3, chất gây độc tế bào, chất hoá trị liệu, và liệu pháp bức xạ. Các ví dụ bổ sung về các liệu pháp /chất trị liệu bổ sung mà có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng LAG3 của sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được dùng theo đường dưới da, trong tĩnh mạch, trong da, trong màng bụng, qua đường miệng, trong cơ, hoặc trong sọ. Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được dùng với liều nằm trong từ khoảng 0,1mg/kg thể trọng đến khoảng 100mg/kg thể trọng của đối tượng.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh hoặc rối loạn mà sẽ có lợi từ việc phong bế sự gắn kết và/hoặc truyền tín hiệu LAG3 như bệnh ung thư.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng khi xem xét phần mô tả chi tiết sau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ của thử nghiệm sinh học LAG3 trên cơ sở luxiferaza được mô tả trong Ví dụ 8 trong bản mô tả này. Tấm (A): chế độ “Đặc hiệu kép”: các tế bào T có nguồn gốc từ Jurkat bất hoạt được hoạt hoá bằng cách tạo cụm thụ thể tế bào T (T-cell receptor-TCR) qua kháng thể đặc hiệu kép CD3xCD20. Tấm (B): chế độ “Peptit”: ở chế độ này, các tế bào T có nguồn gốc từ Jurkat bất hoạt được hoạt hoá bởi phức hợp MHC/peptit đặc hiệu (heterodime Ob2F3 TCR với Protein MHCII, HLA-DR2AB, trong phức hợp với peptit MBP85-99). LAG3 gắn kết với DR2 làm giảm đáp ứng trong các tế bào T có nguồn gốc từ Jurkat được hoạt hoá. Việc phong bế kháng thể LAG3 phóng thích đáp ứng trong các tế bào T có nguồn gốc từ Jurkat được hoạt hoá.

Các hình vẽ Fig.2A-Fig.2B tổng kết các kết quả về hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt đơn lẻ hoặc kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của chuột kháng các khối u ruột kết đã được xác định 26 (được mô tả trong Ví dụ 10). Fig.2A. thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) trong mỗi nhóm điều trị được đo ở nhiều thời điểm sau khi cấy ghép khối u. Việc điều trị được bắt đầu vào ngày 14 khi thể tích khối

u trung bình đạt đến 50mm^3 . Các ngày điều trị được thể hiện bởi các mũi tên. Tất cả các kháng thể được dùng theo đường trong màng bụng (i.p.) ở 10mg/kg . Fig.2B. Các thể tích khối u đơn lẻ trong mỗi nhóm điều trị được đo ở ngày 35 sau cấy ghép. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi ANOVA một chiều với kết quả sau thử nghiệm nhiều so sánh của Dunnett ($*p < 0,05$). Các hình vẽ Fig.2A-Fig.2B. Các nhóm điều trị: lớp kháng thể đối chứng kháng thể đối chứng IgG2a của chuột cống + IgG1 của chuột nhắt (●); kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt + đối chứng IgG1 của chuột nhắt (▲); kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt + đối chứng IgG2a của chuột cống (■); kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt + kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt (▼).

Các hình vẽ Fig.3A-Fig.3B tổng kết các kết quả về hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt đơn lẻ hoặc kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt kháng các khối u MC38 đã được xác định (được mô tả trong Ví dụ 11). Fig.3A. Thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) trong mỗi nhóm điều trị được đo ở nhiều thời điểm sau khi cấy ghép khối u. Việc điều trị được bắt đầu vào ngày 8, khi thể tích khối u trung bình đạt đến 45mm^3 . Các ngày điều trị được thể hiện bởi các mũi tên. Fig.3B. Các thể tích khối u riêng rẽ trong mỗi nhóm điều trị được đo vào ngày 23 sau cấy ghép. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi ANOVA một chiều với thử nghiệm nhiều so sánh của Dunnett ($****p < 0,0001$). Các hình vẽ Fig.3A-Fig.3B. Các nhóm điều trị: lớp kháng thể đối chứng IgG2a của chuột cống + IgG1 của chuột nhắt (●), kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt + đối chứng mIgG1 (▲), kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt + đối chứng IgG2a của chuột cống (■), và kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt + kháng LAG3 của chuột nhắt (▼).

Các hình vẽ Fig.4A-Fig.4B thể hiện các mức độ biểu hiện của các gen IFN γ và CD8b của chuột (được chuẩn hóa với sự biểu hiện cyclophilin B của chuột), như được thử nghiệm bởi phân tích Taqman, trong hạch bạch huyết khô (DLN) (A) và lá lách (B) được gom khi kết thúc thử nghiệm (được mô tả trong Ví dụ 11) từ chuột nhắt mang khối u. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$.

Các hình vẽ Fig.5A-Fig.5B tổng kết hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của người ("mAb1") và kháng thể kháng PD-1 của người (REGN2810) kháng khối u MC38 (được mô tả trong Ví dụ 12). Fig.5A. Thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) trong mỗi nhóm điều trị ở nhiều thời điểm sau cấy ghép khối u. Các ngày điều trị được thể hiện bởi các mũi tên. Fig.5B. Các thể tích khối u đơn lẻ trong mỗi

nhóm được theo dõi trong 24 ngày. Số lượng chuột nhất không có khối u trong mỗi nhóm ở ngày 24 được thể hiện. Các hình vẽ Fig.5A-Fig.5B. Các nhóm điều trị: mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg (■); REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (▲), và kháng thể đối chứng lớp kháng thể người ở 25mg/kg (●).

Các hình vẽ Fig.6A đến Fig.6C tổng kết hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của người (“mAb1”) đơn lẻ hoặc kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của người (REGN2810) kháng khối u MC38 (được mô tả trong Ví dụ 13). Fig.6A. Thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) trong mỗi nhóm điều trị ở nhiều thời điểm sau cấy ghép khối u. Các ngày điều trị được thể hiện bởi các mũi tên. Fig.6B. Các thể tích khối u đơn lẻ trong mỗi nhóm điều trị được đo vào ngày 22 sau cấy ghép. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi ANOVA một chiều với kết quả sau thử nghiệm nhiều so sánh của Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Các hình vẽ Fig.6A-Fig.6B. Các nhóm điều trị: mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg (◆); REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (■); tổ hợp của mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg và REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (▲); đối chứng lớp kháng thể người ở 25mg/kg (●). Fig.6C. Phần trăm sống không có khối u ở chuột nhất được điều trị. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi thử nghiệm xếp hạng nhật ký (Mantel-Cox) (**** $p < 0,0001$). Các nhóm điều trị: mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg (◆); REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (▼); tổ hợp của mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg và REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (▲); đối chứng lớp kháng thể người ở 25mg/kg (●).

Các hình vẽ Fig.7A đến Fig.7C tổng kết hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của người (“mAb1”) đơn lẻ và kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của người (REGN2810) kháng khối u MC38 trong thử nghiệm thứ nhất (được mô tả trong Ví dụ 14). Fig.7A. Thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) trong mỗi nhóm điều trị ở nhiều thời điểm sau cấy ghép khối u. Các ngày điều trị được thể hiện bởi các mũi tên. Fig.7B. Các thể tích khối u đơn lẻ trong mỗi nhóm điều trị được đo vào ngày 22 sau cấy ghép. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi ANOVA một chiều với kết quả sau thử nghiệm nhiều so sánh của Tukey (* $p < 0,05$). Fig.7C. Phần trăm sống không có khối u ở chuột nhất được điều trị. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi thử nghiệm xếp hạng nhật ký (Mantel-Cox) (* $p < 0,0197$). Các nhóm điều trị: mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg (◆); REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (●); REGN2810 (kháng hPD-1) ở 1mg/kg (▲); tổ hợp của mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg và REGN2810 (kháng

hPD-1) ở 10mg/kg (■); tổ hợp của mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg và REGN2810 (kháng hPD-1) ở 1mg/kg (▼); và đối chứng lớp kháng thể người ở 25mg/kg (●).

Các hình vẽ Fig.8A đến Fig.8C tổng kết hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của người (“mAb1”) đơn lẻ và kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của người (REGN2810) kháng khối u MC38 trong thử nghiệm thứ hai (được mô tả trong Ví dụ 14). Fig.8A. Thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) trong mỗi nhóm điều trị ở nhiều thời điểm sau cấy ghép khối u. Các ngày điều trị được thể hiện bởi các mũi tên. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi ANOVA hai chiều với thử nghiệm nhiều so sánh của Dunnett (* $p < 0,05$). Fig.8B. Các thể tích khối u đơn lẻ trong mỗi nhóm điều trị như đo được vào ngày 23 sau cấy ghép. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi ANOVA một chiều với thử nghiệm nhiều so sánh Dunnett (** $p < 0,01$). Fig.8C. Phần trăm sống không chứa tế bào ở chuột nhất được điều trị. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi thử nghiệm xếp hạng nhật ký (Mantel-Cox), với sự điều chỉnh Bonferroni đối với nhiều so sánh (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$). Các nhóm điều trị: mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg (◆); mAb1 (kháng hLAG3) ở 5mg/kg (●); REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (▲); tổ hợp của mAb1 (kháng hLAG3) ở 25mg/kg và REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (■); tổ hợp của mAb1 (kháng hLAG3) ở 5mg/kg và REGN2810 (kháng hPD-1) ở 10mg/kg (▼); và đối chứng lớp kháng thể người ở 25mg/kg (●).

Fig.9 thể hiện thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) trong mỗi nhóm điều trị ở nhiều thời điểm sau cấy ghép khối u trong thử nghiệm để đánh giá hiệu quả của kháng thể kháng LAG3 của người (“mAb1”) đơn lẻ và kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của người (REGN2810) kháng lại khối u MC38 đã được xác định (được mô tả trong Ví dụ 15 trong bản mô tả này). Các ngày điều trị được biểu thị bởi mũi tên.

Fig.10 thể hiện thể tích khối u đơn lẻ trong mỗi nhóm điều trị như đo được vào ngày 22 sau cấy ghép trong thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 15. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi ANOVA một chiều với thử nghiệm nhiều so sánh Dunnett.

Fig.11 thể hiện phần trăm sống không có khối u ở chuột nhất được điều trị trong thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 15 trong bản mô tả này. Ý nghĩa thống kê được xác định bởi thử nghiệm xếp hạng nhật ký (Mantel-Cox), với sự điều chỉnh Bonferroni đối với nhiều so sánh (** $p < 0,01$).

Fig.12 thể hiện sơ đồ về nồng độ mAb1 chức trung bình (+SD) trong huyết

thanh so với thời gian sau một lần truyền trong tĩnh mạch mAb1 duy nhất ở khỉ cái cynomolgus (được mô tả trong Ví dụ 16).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi các phương pháp theo sáng chế được mô tả, cần phải hiểu rằng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương pháp cụ thể và các điều kiện thử nghiệm được mô tả, do đó các phương pháp và các điều kiện này có thể thay đổi. Cũng cần phải hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không có mục đích nhằm làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế, do phạm vi bảo hộ của sáng chế sẽ chỉ được giới hạn bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế thuộc lĩnh vực này. Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong việc thực hiện sáng chế hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên bây giờ được mô tả trong bản mô tả này. Tất cả các tài liệu công bố được đề cập trong bản mô tả này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Thuật ngữ “LAG3” dùng để chỉ protein gen-3 hoạt hoá tế bào lympho, thụ thể điểm kiểm tra miễn dịch hoặc chất đồng ức chế tế bào T, còn được gọi là CD223. Trình tự axit amin của LAG3 có chiều dài đầy đủ được lưu trữ trong GenBank dưới số truy cập NP_002277.4 và trong bản mô tả này cũng được dùng để chỉ SEQ ID NO: 582. Thuật ngữ “LAG3” cũng bao gồm các biến thể protein của LAG3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 574, 575 hoặc 576. Thuật ngữ “LAG3” bao gồm LAG3 tái tổ hợp hoặc mảnh của nó. Thuật ngữ này cũng bao hàm LAG3 hoặc mảnh của nó được ghép nối với, ví dụ, thể histidin, Fc của chuột nhắt hoặc của người, hoặc trình tự tín hiệu như ROR1. Ví dụ, thuật ngữ này bao gồm các trình tự được lấy ví dụ là SEQ ID NO: 575, bao gồm Fc của chuột nhắt (mIgG2a) ở đầu C, được ghép nối với các gốc axit amin từ 29 đến 450 của LAG3 có chiều dài đầy đủ. Các biến thể protein như được lấy ví dụ là SEQ ID NO: 574 bao gồm thể histidin ở đầu C, được ghép nối với các gốc axit amin từ 29 đến 450 của LAG3 có chiều dài đầy đủ. Trừ khi được xác định thuộc

các loài không phải người, thuật ngữ “LAG3” có nghĩa là LAG3 của người.

LAG3 là thành viên của liên họ globulin miễn dịch (Ig). LAG3 là protein xuyên màng typ-1 của axit amin 503 với bốn miền dạng Ig ngoại bào từ D1 đến D4 và được biểu hiện trên các tế bào T được hoạt hoá, tế bào giết tự nhiên, tế bào B, tế bào có tua dạng tương bào, và các tế bào T điều hòa. Thụ thể LAG3 gắn kết với các phân tử MHC nhóm II có mặt trên tế bào trình diện kháng nguyên (APC).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất đồng ức chế tế bào T” dùng để chỉ phối tử và/hoặc thụ thể mà điều biến đáp ứng miễn dịch qua sự hoạt hoá hoặc ngăn chặn tế bào T. Thuật ngữ “chất đồng ức chế tế bào T”, còn được gọi là phân tử cùng truyền tín hiệu tế bào T, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất tế bào theo chương trình 1 (PD-1), kháng nguyên 4 tế bào lympho T gây độc tế bào (CTLA-4), chất làm giảm tế bào lympho B và T (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, globulin miễn dịch tế bào T và muxin 3 (TIM3), thụ thể miễn dịch tế bào T với globulin miễn dịch và ITIM (TIGIT; còn được gọi là VSIG9), thụ thể 1 dạng globulin miễn dịch liên quan đến bạch cầu (LAIR1; còn được gọi là CD305), chất đồng kích tế bào T cảm ứng (ICOS; còn được gọi là CD278), chất ngăn chặn Ig miền V của quá trình hoạt hoá tế bào T (VISTA) và CD160.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả này, có mục đích dùng để chỉ các phân tử globulin miễn dịch gồm có bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết bởi các liên kết disulfua (nghĩa là, “phân tử kháng thể đầy đủ”), cũng như các multime của chúng (ví dụ, IgM) hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Mỗi chuỗi nặng gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (“HCVR” hoặc “V_H”) và vùng hằng định chuỗi nặng (gồm có các miền C_{H1}, C_{H2} và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (“LCVR hoặc “V_L”) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (C_L). Các vùng V_H và V_L còn có thể được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng xác định bổ sung (CDR), được đặt rải rác với các vùng mà được bảo tồn nhiều hơn, gọi là các vùng khung (framework region-(FR). Mỗi V_H và V_L gồm có ba CDR và bốn FR, được bố trí từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án nhất định của sáng chế, các FR của kháng thể (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) có thể giống với các trình tự dòng mầm của người, hoặc có thể được biến đổi tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định dựa vào việc phân tích cạnh

nhau của hai hoặc nhiều CDR.

Sự thay thế của một hoặc nhiều gốc CDR hoặc sự bỏ qua một hoặc nhiều CDR cũng có thể xảy ra. Các kháng thể đã được mô tả trong tài liệu khoa học mà trong đó một hoặc hai CDR có thể được phân tán để gắn kết. Padlan và cộng sự. (1995 FASEB J. 9:133-139) phân tích các vùng tiếp xúc giữa các kháng thể và các kháng nguyên của chúng, dựa vào các cấu trúc tinh thể được công bố và kết luận rằng chỉ có khoảng một phần năm đến một phần ba gốc CDR tiếp xúc thực với kháng nguyên. Padlan cũng đã phát hiện ra nhiều kháng thể mà trong đó một hoặc hai CDR không có axit amin tiếp xúc với kháng nguyên (xem tài liệu, Vajdos và cộng sự 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Các gốc CDR không tiếp xúc với kháng nguyên có thể được nhận biết dựa vào các nghiên cứu trước đó (ví dụ, thường không cần phải có các gốc H60-H65 trong CDRH2), từ các vùng Kabat CDR nằm ngoài Chothia CDR, bằng cách tạo mô hình phân tử và/hoặc theo kinh nghiệm. Nếu CDR hoặc (các) gốc của nó được bỏ qua, nó thường được thay thế bằng axit amin chiếm giữ vị trí tương ứng trong trình tự kháng thể khác của người hoặc sự liên ứng của các trình tự này. Các vị trí để thay thế trong các CDR và các axit amin để thay thế cũng có thể được chọn theo kinh nghiệm. Các thay thế theo kinh nghiệm có thể là sự thay thế bảo tồn hoặc không bảo tồn.

Các kháng thể đơn dòng kháng LAG3 đầy đủ của người được bộc lộ trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế, chèn vào và/hoặc khuyết đoạn axit amin trong các vùng khung và/hoặc vùng CDR của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng mầm tương ứng. Các đột biến này có thể dễ được xác định bằng cách so sánh các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với các trình tự dòng mầm sẵn có, ví dụ, từ các cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công cộng. Sáng chế đề cập đến các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mà có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được tạo đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà từ đó kháng thể có nguồn gốc từ trình tự này, hoặc với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác của người, hoặc với sự thay thế axit amin bảo tồn của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các thay đổi trình tự này trong bản mô tả này được gọi chung là "các đột biến dòng mầm"). Người có hiểu biết trong lĩnh vực này, bắt đầu với các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô

tả này, có thể dễ tạo ra các kháng thể khác nhau và các mảnh gắn kết kháng nguyên mà bao gồm một hoặc nhiều đột biến dòng mầm đơn lẻ hoặc các tổ hợp của nó. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc của vùng khung và/hoặc CDR trong các miền V_H và/hoặc V_L được tạo đột biến ngược thành các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà kháng thể có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án khác, chỉ có một số gốc được tạo đột biến ngược thành trình tự dòng mầm ban đầu, *ví dụ*, chỉ có các gốc đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc trong 8 axit amin sau cùng của FR4, hoặc chỉ có các gốc đột biến được tìm thấy trong CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều của (các) gốc của vùng khung và/hoặc CDR được tạo đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác nhau (nghĩa là, trình tự dòng mầm mà khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc ban đầu từ đó). Hơn nữa, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm trong các vùng khung và/hoặc vùng CDR, *ví dụ*, trong đó một số gốc đơn lẻ được tạo đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm cụ thể trong khi một số gốc khác mà khác với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc được tạo đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác. Một khi thu được, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ được thử nghiệm đối với một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, độ đặc hiệu gắn kết được cải thiện, ái lực gắn kết được gia tăng, các đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận được cải thiện hoặc được tăng cường (như trường hợp có thể có), tính gây miễn dịch giảm, v.v.. Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên thu được theo cách thông thường này nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể đơn dòng kháng LAG3 đầy đủ của người bao gồm các biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này có một hoặc nhiều thay thế bảo tồn. Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 có trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR với, *ví dụ*, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. sự thay thế axit amin bảo tồn tương đối với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng trong bản mô tả này, có mục đích bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ

các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Các mAb của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hoá bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bởi sự đột biến xôma *in vivo*), ví dụ trong các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng trong bản mô tả này, không nhằm bao gồm các mAb trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác (ví dụ, chuột nhắt), đã được ghép trên các trình tự FR của người. Thuật ngữ này bao gồm các kháng thể được tạo ra theo kiểu tái tổ hợp ở động vật có vú không phải người, hoặc trong tế bào của động vật có vú không phải người. Thuật ngữ này không nhằm bao gồm các kháng thể được phân lập hoặc được tạo ra ở đối tượng là người.

Thuật ngữ "tái tổ hợp", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế được tạo ra, được biểu hiện, được phân lập hoặc thu được bởi các kỹ thuật hoặc phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như kỹ thuật ADN tái tổ hợp mà bao gồm, ví dụ, phân cắt và biểu hiện chuyển gen ADN. Thuật ngữ này dùng để chỉ các kháng thể được biểu hiện ở động vật có vú không phải người (bao gồm các động vật có vú chuyển gen không phải người, ví dụ, chuột nhắt chuyển gen) hoặc hệ biểu hiện tế bào (ví dụ, tế bào CHO) hoặc được phân lập từ thư viện kháng thể tổ hợp tái tổ hợp của người.

Thuật ngữ "phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu", như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu, và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu có thể là đặc hiệu đối với các quyết định kháng nguyên khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với các quyết định kháng nguyên của nhiều hơn một polypeptit đích. Phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu có thể là một polypeptit đa chức hoặc có thể là phức hợp multimer của hai hoặc nhiều polypeptit mà được kết hợp động hoá trị hoặc không cộng hoá trị với nhau. Thuật ngữ "phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu" bao gồm các kháng thể theo sáng chế mà có thể được liên kết với hoặc đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng cách ghép nối hoá học, dung hợp gen, liên kết không cộng hoá trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều thực thể

phân tử khác, như protein hoặc mảnh của nó để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu với độ đặc hiệu gắn kết thứ hai. Theo sáng chế, thuật ngữ “phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu” cũng bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được liên kết hoạt động với kháng thể khác hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép với độ đặc hiệu gắn kết thứ hai. Các kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu theo sáng chế cũng được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” hoặc “gắn kết đặc hiệu với”, hoặc thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tạo ra phức hợp với kháng nguyên mà tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Sự gắn kết đặc hiệu có thể được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất khoảng $1 \times 10^{-8} \text{M}$ hoặc nhỏ hơn (ví dụ, K_D nhỏ hơn có nghĩa là sự gắn kết chặt chẽ hơn). Đã biết các phương pháp xác định xem liệu hai phân tử có gắn kết đặc hiệu hay không trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, sự thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và các dạng tương tự. Như được mô tả trong bản mô tả này, các kháng thể đã được nhận biết bởi cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™, mà gắn kết đặc hiệu với LAG3. Hơn nữa, các kháng thể đa đặc hiệu mà gắn kết với một miền trong LAG3 và một hoặc nhiều kháng nguyên bổ sung hoặc đặc hiệu kép mà gắn kết với hai vùng khác nhau của LAG3 cũng được xem là các kháng thể “gắn kết đặc hiệu”, như được sử dụng trong bản mô tả này.

Thuật ngữ kháng thể có “ái lực cao” dùng để chỉ các kháng thể mAb có ái lực gắn kết với LAG3, được biểu hiện là K_D , ít nhất 10^{-8}M ; tốt hơn là 10^{-9}M ; tốt hơn nữa là 10^{-10}M , thậm chí tốt hơn nữa là 10^{-11}M , thậm chí tốt hơn nữa là 10^{-12}M , như đo được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™ hoặc ELISA ái lực dung dịch.

Thuật ngữ “tốc độ chậm”, “K_{off}” hoặc “k_d” có nghĩa là kháng thể mà phân ly ra khỏi LAG3, với hằng số tốc độ $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, như xác định được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™.

Các thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể, “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể và thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein có trong tự nhiên, thu được bằng enzym, tổng hợp hoặc được thao tác di truyền mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo ra

phức hợp. Các thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể hoặc "mảnh kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà vẫn có khả năng gắn kết với LAG3.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với gốc như phối tử hoặc gốc điều trị ("thể liên hợp miễn dịch"), như chất gây độc tế bào, kháng thể kháng LAG3 thứ hai, kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu khối u, được chất kháng bệnh ung thư, hoặc gốc trị liệu khác bất kỳ hữu ích để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh bao gồm bệnh ung thư hoặc nhiễm virus bao gồm nhiễm virus mạn tính.

"Kháng thể phân lập", như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm dùng để chỉ kháng thể mà gần như không chứa các kháng thể khác (Abs) có các độ đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với LAG3, hoặc mảnh của nó, gần như không chứa Abs mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên không phải LAG3).

"Phong bế kháng thể" hoặc "làm trung hoà kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này (hoặc "kháng thể mà trung hoà hoạt tính LAG3" hoặc "kháng thể đối kháng"), nhằm dùng để chỉ kháng thể mà có gắn kết với LAG3 dẫn đến ức chế ít nhất một hoạt tính sinh học của LAG3. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể ngăn ngừa hoặc phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II.

"Hoạt hoá kháng thể" hoặc "làm tăng cường kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này (hoặc "kháng thể chủ vận"), nhằm dùng để chỉ kháng thể mà có gắn kết với LAG3 dẫn đến sự làm tăng hoặc kích thích ít nhất một hoạt tính sinh học của LAG3. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể làm làm tăng sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II.

Thuật ngữ "cộng hưởng plasmon bề mặt", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ hiện tượng quang học mà cho phép phân tích các tương tác phân tử sinh học theo thời gian thực nhờ sự phát hiện các thay đổi về nồng độ protein trong cơ chất cảm biến sinh học, ví dụ bằng cách sử dụng hệ BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Thuật ngữ " K_D ", như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm dùng để chỉ hằng số phân ly cân bằng của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” dùng để chỉ thể quyết định kháng nguyên mà tương tác với vị trí gắn kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của phân tử kháng thể đã biết là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể gắn kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” cũng dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc tế bào T đáp ứng. Nó cũng dùng để chỉ vùng kháng nguyên mà được gắn kết bởi kháng thể. Các quyết định kháng nguyên có thể được xác định theo cấu trúc hoặc chức năng. Các quyết định kháng nguyên chức năng thường là tập hợp con của các quyết định kháng nguyên cấu trúc và có các gốc mà góp phần trực tiếp vào ái lực tương tác. Các quyết định kháng nguyên cũng có thể là cấu dạng, tức là, gồm có các axit amin không tuyến tính. Theo các phương án nhất định, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các thể quyết định mà là các nhóm phân tử bề mặt có hoạt tính về mặt hoá học như axit amin, chuỗi bên đường, nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl, và theo các phương án nhất định, có thể có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc hiệu và/hoặc các đặc điểm mang điện tích đặc hiệu.

Thuật ngữ “cạnh tranh chéo”, như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với kháng nguyên và ức chế hoặc phong bế sự gắn kết của kháng thể khác hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Thuật ngữ này cũng bao gồm sự cạnh tranh giữa hai kháng thể theo cả hai hướng, nghĩa là, kháng thể thứ nhất mà gắn kết và phong bế sự gắn kết của kháng thể thứ hai và ngược lại. Theo các phương án nhất định, kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai có thể gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên. Theo cách khác, kháng thể thứ nhất và thứ hai có thể gắn kết với các quyết định kháng nguyên khác nhau nhưng không xếp chồng sao cho sự gắn kết của một kháng thể ức chế hoặc phong bế sự gắn kết của kháng thể thứ hai, *ví dụ*, qua sự cản trở không gian. Sự cạnh tranh chéo giữa các kháng thể có thể đo được bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, *ví dụ*, bởi thử nghiệm giao thoa hai lớp không đánh dấu theo thời gian thực. Sự cạnh tranh chéo giữa hai kháng thể có thể được biểu hiện dưới dạng gắn kết của kháng thể thứ hai mà ít hơn tín hiệu cơ bản do tự gắn kết (trong đó kháng thể thứ nhất và thứ hai là cùng một kháng thể). Sự cạnh tranh chéo giữa 2 kháng thể có thể được biểu hiện, *ví dụ*, dưới dạng % mức gắn kết của kháng thể thứ hai mà nhỏ hơn mức tự gắn kết cơ bản

(trong đó kháng thể thứ nhất và thứ hai là cùng một kháng thể).

Thuật ngữ "gần như tương đồng" hoặc "gần như đồng nhất", khi dùng để chỉ axit nucleic hoặc mảnh của nó, biểu thị rằng, khi được sắp thẳng hàng tối ưu với sự chèn vào hoặc khuyết đoạn nucleotit thích hợp với axit nucleic khác (hoặc sợi bổ sung của nó), có độ tương đồng trình tự nucleotit ít nhất khoảng 90%, và tốt hơn nữa ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% bazơ nucleotit, như đo được bởi thuật toán độ tương đồng trình tự đã biết bất kỳ, như được trình bày dưới đây. Phân tử axit nucleic gần như tương đồng với phân tử axit nucleic tham chiếu có thể, trong một số trường hợp, mã hoá polypeptit có cùng một trình tự axit amin hoặc có trình tự axit amin gần như tương đồng với polypeptit được mã hoá bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Độ tương đồng trình tự có thể được tính toán bằng cách sử dụng thuật toán, ví dụ, thuật toán Needleman Wunsch (Needleman and Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) để sắp thẳng hàng tổng thể, hoặc thuật toán Smith Waterman (Smith and Waterman 1981, J. Mol. Biol. 147: 195-197) để sắp thẳng hàng cục bộ. Thuật toán được ưu tiên khác được mô tả bởi Dufresne và cộng sự trong tài liệu Nature Biotechnology in 2002 (tập 20, pp. 1269-71) và được sử dụng trong phần mềm GenePAST (GQ Life Sciences, Inc. Boston, MA).

Như được áp dụng cho polypeptit, thuật ngữ "gần như tương đồng" hoặc "gần như tương đồng" có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được sắp thẳng hàng tối ưu, như bởi các chương trình GAP hoặc BESTFIT bằng cách sử dụng trọng số khoảng trống mặc định, có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 90% độ tương đồng trình tự, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95%, 98% hoặc 99%. Tốt hơn là, các vị trí gốc, mà không giống nhau, khác bởi các sự thay thế axit amin bảo tồn. "Sự thay thế axit amin bảo tồn" là sự thay thế mà trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) với các đặc tính hoá học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Nói chung, sự thay thế axit amin bảo tồn sẽ gần như không làm thay đổi các đặc tính chức năng của protein. Trong trường hợp mà trong đó hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi các sự thay thế bảo tồn, thì phần trăm hoặc mức độ tương tự có thể được điều chỉnh tăng để hiệu chỉnh bản chất bảo tồn của sự thay thế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết phương tiện để thực hiện việc điều chỉnh này. Xem, ví dụ, tài liệu Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, mà được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các ví dụ về nhóm axit amin mà có các

chuỗi bên với các đặc tính hoá học tương tự bao gồm 1) chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; 2) chuỗi bên béo-hydroxyl: serin và threonin; 3) chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; 4) chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; 5) chuỗi bên bazơ: lysin, arginin, và histidin; 6) chuỗi bên axit: aspartat và glutamat, và 7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo tồn được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, sự thay thế bảo tồn là sự thay đổi bất kỳ có trị số dương trong ma trận khả năng xảy ra nhật ký PAM250 được bộc lộ trong tài liệu Gonnet và cộng sự (1992) Science 256: 1443-45, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Sự thay thế "bảo tồn ở mức độ vừa phải" là sự thay đổi bất kỳ có trị số không âm trong ma trận khả năng xảy ra nhật ký PAM250.

Độ tương đồng trình tự đối với các polypeptit thường đo được bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein so khớp các trình tự tương tự bằng cách sử dụng các biện pháp về độ tương đồng được gán cho các thay thế, khuyết đoạn và các cải biến khác nhau khác, bao gồm sự thay thế axit amin bảo tồn. Ví dụ, phần mềm GCG chứa các chương trình như GAP và BESTFIT mà có thể được sử dụng với các tham số mặc định để xác định tính tương đồng trình tự hoặc độ tương đồng trình tự giữa các polypeptit có liên quan chặt chẽ, như các polypeptit tương đồng từ các loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu dại và mutein của nó. Xem, ví dụ, GCG Version 6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh bằng cách sử dụng FASTA với các tham số mặc định hoặc tham số được khuyến nghị; chương trình trong GCG Version 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) tạo ra sự sắp thẳng hàng và phần trăm độ tương đồng trình tự của các vùng xếp chồng nhiều nhất giữa các trình tự truy vấn và trình tự tìm kiếm (tài liệu Pearson (2000) trên đây). Thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa số lượng lớn trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng các tham số mặc định. Xem, ví dụ, tài liệu Altschul và cộng sự (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 và (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, nội dung của mỗi tài liệu được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Cụm từ "lượng có hiệu quả trị liệu" có nghĩa là lượng mà tạo ra tác dụng mong

muốn mà nó được dùng. Lượng chính xác sẽ tùy thuộc vào mục đích điều trị, và có thể xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết (xem, ví dụ, tài liệu Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” dùng để chỉ động vật, tốt hơn là động vật có vú, cần làm thuyên giảm, ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn như nhiễm virus hoặc bệnh ung thư. Thuật ngữ này bao gồm các đối tượng là con người mà có hoặc có nguy cơ mắc bệnh ung thư, bệnh ung thư di căn hoặc nhiễm virus.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “dược chất kháng bệnh ung thư” có nghĩa là chất bất kỳ hữu ích để điều trị hoặc làm giảm hoặc ức chế bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất gây độc tế bào và các chất như các chất chống chuyển hoá, chất alkyl hoá, anthracyclin, thuốc kháng sinh, các chất chống nguyên phân, procarbazine, hydroxyurea, asparaginase, corticosteroid, cyclophosphamide, mitotane (O,P'-(DDD)), các chất sinh học (ví dụ, các kháng thể và interferon) và các chất phóng xạ. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “gây độc tế bào hoặc chất gây độc tế bào”, cũng dùng để chỉ chất hoá trị liệu và có nghĩa là chất bất kỳ mà gây hại cho tế bào. Các ví dụ bao gồm Taxol® (paclitaxel), temozolamide, xylocastatin B, gramicidin D, etidronat bromua, emetin, cisplatin, mitomycin, etoposide, teniposide, vincristin, vinorelbine, coicixine, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracinone, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoid, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, và puromycin và các chất tương tự hoặc chất tương đồng của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dược chất kháng virus” dùng để chỉ dược chất bất kỳ hoặc liệu pháp được sử dụng để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm sự nhiễm virus ở vật chủ. Thuật ngữ “dược chất kháng virus” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở zidovudine, lamivudine, abacavir, ribavirin, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirine, chất làm giảm đau và corticosteroid. Theo sáng chế, sự nhiễm virus bao gồm sự nhiễm kéo dài hoặc mạn tính do virus gây ra bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virus viêm gan B (HBV), virus viêm gan C (HCV), virus gây u nhú ở người (HPV), virus gây bệnh viêm màng não-màng nhện tăng tế bào lympho (LCMV), và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “làm tăng cường đáp ứng miễn dịch”, dùng để chỉ sự làm tăng về hoạt tính của tế bào miễn dịch như tế bào T hoặc tế bào NK kháng tế bào khối u hoặc tế bào nhiễm virus. Theo sáng chế, thuật ngữ này bao gồm việc phong bế sự ức chế hoạt tính của tế bào T qua trung gian LAG3 hoặc phóng thích hoặc đảo ngược trạng thái làm kiệt của các tế bào T. Thuật ngữ này cũng bao gồm sự ức chế hoạt tính của tế bào T điều hòa. Đáp ứng miễn dịch tăng cường, như được sử dụng theo sáng chế, dẫn đến việc giết tế bào khối u tăng lên và/hoặc ức chế sự phát triển của khối u.

Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với LAG3 và làm tăng cường sự hoạt hoá tế bào T. Kháng thể kháng LAG3 có thể gắn kết với LAG3 với ái lực cao hoặc với ái lực thấp. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể phong bế trong đó các kháng thể này có thể gắn kết với LAG3 và ức chế sự truyền tín hiệu LAG3. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II và/hoặc kích thích hoặc làm tăng cường sự hoạt hoá tế bào T. Theo một số phương án, các kháng thể gắn kết với LAG3 và đảo ngược trạng thái suy nhược của tế bào T bị làm kiệt. Theo các phương án nhất định, các kháng thể gắn kết với LAG3 và ức chế hoạt tính tế bào T điều hòa. Theo một số phương án, các kháng thể có thể là hữu ích để kích thích hoặc làm tăng cường đáp ứng miễn dịch và/hoặc để điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc nhiễm virus. Các kháng thể khi được dùng cho đối tượng cần điều trị này có thể làm giảm sự nhiễm virus mạn tính như HIV, LCMV hoặc HBV ở đối tượng. Chúng cũng có thể được sử dụng để ức chế sự phát triển của tế bào khối u ở đối tượng. Chúng có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc dưới dạng liệu pháp phụ với các gốc trị liệu hoặc phương thức trị liệu khác đã biết trong lĩnh vực điều trị bệnh ung thư, hoặc nhiễm virus.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 có thể là các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu, trong đó chúng bao gồm độ đặc hiệu gắn kết thứ nhất với LAG3 và độ đặc hiệu gắn kết thứ hai với kháng nguyên được chọn từ nhóm gồm có chất đồng ức chế tế bào T khác và quyết định kháng nguyên khác của LAG3.

Chất sinh miễn dịch bao gồm chất bất kỳ trong số các chất sau có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể kháng LAG3. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế thu được từ chuột được gây miễn dịch với LAG3 nguyên thể với

chiều dài đầy đủ (xem NCBI số truy cập NP_002277.4) (SEQ ID NO:582), hoặc với LAG3 peptit tái tổ hợp. Theo cách khác, LAG3 hoặc mảnh của nó có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật hoá sinh tiêu chuẩn và được cải biến (SEQ ID NO:574 đến 576) và được sử dụng làm chất gây miễn dịch.

Theo các phương án nhất định, chất sinh miễn dịch là một hoặc nhiều miền ngoại bào của LAG3. Theo một phương án của sáng chế, chất gây miễn dịch là mảnh của LAG3 mà nằm trong khoảng các gốc axit amin từ 29 đến 450 nêu trong SEQ ID NO:582.

Theo một số phương án, chất sinh miễn dịch có thể là peptit LAG3 tái tổ hợp được biểu hiện trong *E. coli* hoặc trong tế bào nhân chuẩn hoặc tế bào động vật có vú khác như tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO).

Theo các phương án nhất định, các kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các mảnh của các vùng nêu trên hoặc các peptit kéo dài ra quá vùng được xác định khoảng từ 5 đến 20 gốc axit amin từ một hoặc cả hai đầu N hoặc C của các vùng được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, tổ hợp bất kỳ của các vùng nêu trên hoặc mảnh của nó có thể được sử dụng trong việc tạo ra các kháng thể đặc hiệu LAG3.

Các peptit có thể được biến đổi để bao gồm việc bổ sung hoặc thay thế các gốc nhất định để tạo thể hoặc nhằm mục đích liên hợp với các phân tử mang, như KLH. Ví dụ, xystein có thể được bổ sung vào ở đầu N hoặc đầu C của peptit, hoặc trình tự liên kết có thể được bổ sung vào để tạo ra peptit để liên hợp với, ví dụ, KLH để gây miễn dịch.

Một số kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế có khả năng gắn kết với và làm trung hoà hoạt tính của LAG3, như xác định được bởi các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo*. Khả năng của các kháng thể theo sáng chế gắn kết với và làm trung hoà hoạt tính của LAG3 có thể được đo bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm các thử nghiệm gắn kết hoặc thử nghiệm hoạt tính, như được mô tả trong bản mô tả này.

Các thử nghiệm *in vitro* làm ví dụ không giới hạn để đo hoạt tính gắn kết được minh hoạ trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế trong bản mô tả này. Trong Ví dụ 3, các ái lực gắn kết và các hằng số động học của kháng thể kháng LAG3 của người

đối với LAG3 của người được xác định bởi cộng hưởng plasmon bề mặt và các lần đo được thực hiện trên thiết bị Biacore 4000 hoặc T200. Trong Ví dụ 4, các thử nghiệm phong bế được sử dụng để xác định sự cạnh tranh chéo giữa kháng thể kháng LAG3. Các Ví dụ 5 và 6 mô tả sự gắn kết của kháng thể với tế bào biểu hiện quá mức LAG3. Trong Ví dụ 7, các thử nghiệm gắn kết được sử dụng để xác định khả năng của kháng thể kháng LAG3 phong bế khả năng gắn kết MHC nhóm II của LAG3 *in vitro*. Trong Ví dụ 8, thử nghiệm luxiferaza được sử dụng để xác định khả năng của kháng thể kháng LAG3 tạo đối kháng sự truyền tín hiệu LAG3 trong các tế bào T. Trong Ví dụ 9, thử nghiệm huỳnh quang được sử dụng để xác định khả năng của kháng thể kháng LAG3 gắn kết với tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ của khối được hoạt hoá.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có khả năng làm tăng cường hoặc kích thích hoạt tính tế bào T *in vitro*, ở đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc ở đối tượng bị nhiễm virus như LCMV. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất trị liệu thứ hai, như kháng thể kháng chất đồng ức chế tế bào T thứ hai, để làm tăng cường đáp ứng miễn dịch và ức chế sự phát triển của khối u ở đối tượng.

Các kháng thể đặc hiệu đối với LAG3 có thể không chứa các chất đánh dấu hoặc các gốc bổ sung hoặc chúng có thể chứa chất đánh dấu hoặc gốc đầu N hoặc đầu C. Theo một phương án, chất đánh dấu hoặc phần này là biotin. Trong thử nghiệm gắn kết, vị trí của chất đánh dấu (nếu có) có thể xác định hướng của peptit tương đối với bề mặt mà trên đó peptit được gắn kết. Ví dụ, nếu bề mặt được phủ bằng avidin, peptit chứa biotin đầu N sẽ được định hướng sao cho phần đầu C của peptit sẽ cách xa bề mặt này. Theo một phương án, chất đánh dấu có thể là nuclit phóng xạ, thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc chất đánh dấu phát hiện được bởi MRI. Theo các phương án nhất định, kháng thể được đánh dấu này có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán bao gồm các thử nghiệm tạo ảnh.

Các phương án ví dụ của sáng chế

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với protein của gen 3 hoạt hoá tế bào lympho (LAG3) của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có đặc tính được chọn từ nhóm gồm có: (a) gắn kết LAG3 monome của người

với hằng số cân bằng phân ly gắn kết (K_D) nhỏ hơn khoảng 10nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C; (b) gắn kết LAG3 monome của người với K_D nhỏ hơn khoảng 8nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C; (c) gắn kết LAG3 dime của người với K_D nhỏ hơn khoảng 1,1nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C; (d) gắn kết LAG3 dime của người với K_D nhỏ hơn khoảng 1nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C; (e) gắn kết với tế bào biểu hiện hLAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 8nM như đo được trong thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy; (f) gắn kết với tế bào biểu hiện mLAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,3nM như đo được trong thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy; (g) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II của người với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 32nM như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào; (h) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II của chuột với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 30nM như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào; (i) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II nhiều hơn 90% như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào; (j) phóng thích sự ức chế hoạt tính tế bào T qua trung gian LAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 9nM như xác định được trong thử nghiệm thông báo luxiferaza; và (k) gắn kết với tế bào T CD4+ và CD8+ được hoạt hoá với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1,2nM, như xác định được trong thử nghiệm huỳnh quang.

Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (CDR) (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) có trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được liệt kê trong Bảng 1; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) có trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự HCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự LCVR được liệt kê trong Bảng 1.

Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa: (a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180,

196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540, và 556; (b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542, và 558; (c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544, và 560; (d) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548, và 564; (e) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550, và 566; và (f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552, và 568.

Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546, và 554/562.

Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 7 yêu cầu bảo hộ, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 386/394, 418/426, và 538/546.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà phong bế sự gắn kết LAG3 với MHC nhóm II chứa ba CDR của HCVR, trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có

trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538, và 554; và ba CDR của LCVR, trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546, và 562.

Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 386/394, 418/426, và 538/546.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà cạnh tranh gắn kết với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546, và 554/562.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, 386/394, 402/410, 418/426, 434/442, 450/522, 458/522, 466/522, 474/522, 482/522, 490/522, 498/530, 506/530, 514/530, 538/546, và 554/562.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà là kháng thể người, kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể khảm. Ví dụ, kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể là kháng thể IgG1 hoặc IgG4, như *ví dụ*, kháng thể IgG1 hoặc IgG4 của người. Các vùng hằng định của các kháng thể này có thể tương ứng với các vùng hằng định kiểu đại hoặc với các vùng hằng định mà các đột biến đã được đưa vào đó.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 577, 579, và 580. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 578, và 581. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin chuỗi nặng/chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 577/578, 579/578, và 580/581.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu có độ đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 và độ đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với quyết định kháng nguyên đích thứ hai.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử polynucleotit phân lập và vector có trình tự polynucleotit của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phân tử polynucleotit phân lập và/hoặc vector có trình tự polynucleotit mà mã hoá HCVR của kháng thể như được nêu trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phân tử polynucleotit phân lập và/hoặc vector có trình tự polynucleotit mà mã hoá LCVR của kháng thể như được nêu trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước dùng dược phẩm chứa kháng thể kháng LAG3 phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế tế bào T điều hòa (Treg) ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước dùng dược phẩm chứa kháng thể kháng LAG3 phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng cường sự hoạt hoá tế bào T ở đối

tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước dùng dược phẩm chứa kháng thể kháng LAG3 phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm gồm có bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não, ung thư biểu mô tế bào thận (ví dụ, ung thư biểu mô thận tế bào thận nước trong), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú âm tính bộ ba), bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, bệnh ung thư đại trực tràng, u trung biểu mô, u lympho (ví dụ, bệnh ung thư mô bạch huyết tế bào B, bệnh ung thư mô bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán) và khối u hắc tố. Theo các phương án nhất định, đối tượng bị nhiễm virus mạn tính do virus được chọn từ nhóm gồm có virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virus viêm gan C (HCV), virus viêm gan B (HBV), virus gây u nhú ở người (HPV), virus gây bệnh viêm màng não-màng nhện tăng tế bào lympho (LCMV) và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV) gây ra. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 được dùng cho đối tượng kết hợp với chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm gồm có chất ức chế PD-1, chất ức chế CTLA, kháng thể kháng kháng nguyên đặc hiệu khối u, kháng thể kháng kháng nguyên tế bào nhiễm virus, chất ức chế PD-L1, chất ức chế CD20, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 và CD3, chất bổ sung khâu phân ăn như chất chống oxy hoá, chất đối kháng VEGF, chất hoá trị liệu, chất gây độc tế bào, bức xạ, NSAID, corticosteroid, và liệu pháp khác bất kỳ hữu ích để làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng có liên quan đến bệnh hoặc rối loạn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển của khối u hoặc tế bào khối u ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị này cùng lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, khối u là khối u nguyên phát hoặc khối u tái phát. Theo các phương án nhất định, khối u là khối u đã được xác định. Theo các phương án nhất định, đối tượng mắc bệnh di căn và/hoặc đã được điều trị bằng liệu pháp trước. Theo các phương án nhất định, khối u có mặt ở đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm gồm có bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung

thư vú, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, bệnh ung thư đại trực tràng, u trung biểu mô, u lympho và khối u hạch tố. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được dùng dưới dạng một hoặc nhiều liều trong đó mỗi liều được dùng từ 1 đến 4 tuần sau ngay liều trước. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được dùng với liều khoảng 0,1mg/kg thể trọng đến 100mg/kg thể trọng của đối tượng. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 được dùng cho đối tượng kết hợp với chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm gồm có chất ức chế PD-1, chất ức chế CTLA, kháng thể kháng kháng nguyên đặc hiệu khối u, chất ức chế PD-L1, chất ức chế CD20, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 và CD3, chất bổ sung khẩu phần ăn như chất chống oxy hoá, chất đối kháng VEGF, chất hoá trị liệu, chất gây độc tế bào, bức xạ, NSAID, corticosteroid, và liệu pháp khác bất kỳ hữu ích để làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng có liên quan đến bệnh hoặc rối loạn. Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai là chất ức chế PD-1 trong đó chất ức chế PD-1 này là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với PD-1. Theo một phương án, chất ức chế PD-1 là REGN2810. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được dùng theo đường dưới da, trong tĩnh mạch, trong da, trong màng bụng, qua đường miệng, trong cơ hoặc trong sọ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phóng thích sự ức chế hoạt tính tế bào T qua trung gian LAG3, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc với kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một phương án, tế bào T được cho tiếp xúc bởi kháng thể kháng LAG3 của sáng chế kết hợp với kháng thể kháng PD-1 (ví dụ, REGN2810).

Mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể

Trừ khi có quy định khác, cần phải hiểu rằng thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm các phân tử kháng thể chứa hai chuỗi nặng globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (nghĩa là, "các phân tử kháng thể đầy đủ") cũng như mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Các thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể và

các dạng tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein có trong tự nhiên, thu được về mặt enzym, tổng hợp, hoặc được tạo ra về mặt di truyền mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo ra phức hợp. Các thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể hoặc "mảnh kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể mà vẫn có khả năng gắn kết đặc hiệu với LAG3. Mảnh kháng thể có thể bao gồm mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, mảnh Fv, mảnh dAb, mảnh chứa CDR, hoặc CDR phân lập. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" dùng để chỉ mảnh polypeptit của phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu. Theo các phương án như vậy, thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" bao gồm, *ví dụ*, phân tử MHC nhóm II mà gắn kết đặc hiệu với LAG3. Mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được tạo ra, *ví dụ*, từ các phân tử kháng thể đầy đủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp như tiêu hoá phân giải protein hoặc kỹ thuật thao tác di truyền tái tổ hợp bao gồm thao tác và biểu hiện ADN mã hoá các miền biến đổi của kháng thể và (tuỳ ý) miền hằng định của kháng thể. Đã biết ADN này và/hoặc sẵn có từ, *ví dụ*, các nguồn thương mại, thư viện ADN (bao gồm, *ví dụ*, thư viện thể thực khuẩn-kháng thể) hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được lập trình tự và được thao tác về mặt hoá học hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, *ví dụ*, để bố trí một hoặc nhiều miền biến đổi và/hoặc miền hằng định thành cấu trúc thích hợp hoặc đưa các mã bộ ba, tạo ra các gốc xystein, biến đổi, bổ sung hoặc khuyết đoạn axit amin, v.v..

Các ví dụ không giới hạn về mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh $F(ab')_2$; (iii) mảnh Fd; (iv) mảnh Fv; (v) các phân tử Fv chuỗi đơn (scFv); (vi) mảnh dAb; và (vii) các đơn vị nhận biết tối thiểu gồm có các gốc axit amin mà mô phỏng vùng siêu biến của kháng thể (*ví dụ*, vùng xác định bổ sung phân lập (CDR) như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 cưỡng bức. Các phân tử được thao tác khác, như các kháng thể đặc hiệu miền, các kháng thể một miền, các kháng thể xoá miền, các kháng thể khảm, các kháng thể ghép CDR, diabody, triabody, tetrabody, minibody, nanobody (*ví dụ* các nanobody hoá trị một, nanobody hoá trị hai, v.v.), các được phẩm miễn dịch mô đun nhỏ (SMIP), và các miền IgNAR biến đổi mạnh, cũng được bao hàm trong cụm từ "mảnh gắn kết kháng nguyên", như được sử dụng trong bản mô tả này.

Nói chung, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể sẽ bao gồm ít nhất một

miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích cỡ bất kỳ hoặc chế phẩm axit amin và thường sẽ bao gồm ít nhất một CDR, mà liền kề với hoặc trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong mảnh gắn kết kháng nguyên có miền V_H liên quan đến miền V_L , các miền V_H và V_L có thể được định vị tương đối với nhau theo cách bố trí thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa dime $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ hoặc $V_L - V_L$. Theo cách khác, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L monome.

Theo các phương án nhất định, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hoá trị với ít nhất một miền hằng định. Các cấu trúc làm ví dụ không giới hạn của các miền biến đổi và miền hằng định mà có thể được tìm thấy trong mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) $V_H - C_H1$; (ii) $V_H - C_H2$; (iii) $V_H - C_H3$; (iv) $V_H - C_H1 - C_H2$; (v) $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (vi) $V_H - C_H2 - C_H3$; (vii) $V_H - C_L$; (viii) $V_L - C_H1$; (ix) $V_L - C_H2$; (x) $V_L - C_H3$; (xi) $V_L - C_H1 - C_H2$; (xii) $V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (xiii) $V_L - C_H2 - C_H3$; và (xiv) $V_L - C_L$. Theo cấu trúc bất kỳ của các miền biến đổi và miền hằng định, bao gồm cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc được liệt kê trên đây, các miền biến đổi và hằng định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bởi vùng bản lề hoặc vùng liên kết đầy đủ hoặc một phần. Vùng bản lề có thể gồm có ít nhất 2 axit amin (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn), mà dẫn đến sự liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa các miền biến đổi và/hoặc miền hằng định liền kề trong một phân tử polypeptit. Hơn nữa, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm homo-dime hoặc hetero-dime (hoặc multimer khác) có cấu trúc miền bất kỳ trong số các cấu trúc miền biến đổi và hằng định được liệt kê trên đây liên kết không cộng hoá trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bởi (các) liên kết disulfua).

Như với các phân tử kháng thể đầy đủ, mảnh gắn kết kháng nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Nói chung, mảnh gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể sẽ thường bao gồm ít nhất hai miền biến đổi khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên riêng rẽ hoặc với quyết định kháng nguyên khác trên cùng một kháng nguyên. Dạng kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, bao gồm các dạng kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể được làm thích ứng để sử dụng trong ngữ cảnh

của mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường sẵn có trong lĩnh vực này.

Tạo ra kháng thể người

Đã biết các phương pháp tạo ra kháng thể người ở chuột nhắt chuyển gen trong lĩnh vực này. Các phương pháp đã biết bất kỳ này có thể được sử dụng theo sáng chế để tạo ra các kháng thể người mà gắn kết đặc hiệu với LAG3.

Bằng cách sử dụng kỹ thuật VELOCIMMUNE® (xem, ví dụ, patent Mỹ số US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) hoặc phương pháp đã biết khác bất kỳ để tạo ra các kháng thể đơn dòng, các kháng thể khả ái lực cao kháng LAG3 được phân lập ban đầu có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột nhắt. Kỹ thuật VELOCIMMUNE® bao gồm việc tạo ra chuột chuyển gen có hệ gen chứa các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được liên kết hoạt động với các locut vùng hằng định nội sinh của chuột nhắt sao cho chuột nhắt này tạo ra kháng thể chứa vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột nhắt đáp ứng sự kích thích kháng nguyên. ADN mã hoá các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được phân lập và được liên kết hoạt động với ADN mã hoá các vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người. Tiếp theo, ADN được biểu hiện trong tế bào có khả năng biểu hiện kháng thể đầy đủ của người.

Thông thường, chuột nhắt VELOCIMMUNE® được cho thách thức với kháng nguyên được đề cập và tế bào bạch huyết (như tế bào B) được thu gom từ chuột nhắt mà biểu hiện kháng thể. Tế bào bạch huyết có thể được dung hợp với dòng tế bào u tuỷ để tạo ra dòng tế bào lai bất tử và dòng tế bào lai này được sàng lọc và được chọn để nhận biết các dòng tế bào lai mà tạo ra các kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên được đề cập. ADN mã hoá các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được phân lập và được liên kết với các vùng hằng định lớp kháng thể mong muốn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Protein của kháng thể này có thể được tạo ra trong tế bào, như tế bào CHO. Theo cách khác, ADN mã hoá các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên hoặc các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được phân lập trực tiếp từ các tế bào lympho đặc hiệu kháng nguyên.

Ban đầu, các kháng thể khả ái lực cao được phân lập có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột nhắt. Như trong phần thử nghiệm dưới đây, các

kháng thể được đặc trưng và được chọn đối với các đặc điểm mong muốn, bao gồm ái lực, tính lựa chọn, quyết định kháng nguyên, v.v.. Các vùng hằng định của chuỗi nhất được thay thế bằng vùng hằng định của người mong muốn để tạo ra kháng thể đầy đủ của người theo sáng chế, ví dụ IgG1 hoặc IgG4 kiểu đại hoặc được biến đổi. Trong khi vùng hằng định được chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể, các đặc điểm gắn kết kháng nguyên ái lực cao và độ đặc hiệu đích vẫn còn lại trong vùng biến đổi.

Các dạng tương đương sinh học

Kháng thể kháng LAG3 và mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm protein có các trình tự axit amin mà thay đổi so với các trình tự của kháng thể được mô tả, nhưng vẫn có khả năng gắn kết LAG3. Các kháng thể biến thể này và các mảnh kháng thể bao gồm một hoặc nhiều sự bổ sung, khuyết đoạn, hoặc thay thế axit amin khi so với trình tự ban đầu, nhưng biểu hiện hoạt tính sinh học mà gần như tương đương với hoạt tính sinh học của các kháng thể mong muốn. Tương tự, trình tự ADN mã hoá kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự mà có một hoặc nhiều sự bổ sung, khuyết đoạn hoặc thay thế nucleotit khi so với trình tự theo sáng chế, nhưng mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà gần như tương đương sinh học với kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế.

Hai protein gắn kết kháng nguyên hoặc kháng thể, được cho là dạng tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng là dạng tương đương được phẩm hoặc dạng thay thế được phẩm mà tốc độ và mức độ hấp thụ của chúng không thể hiện sự khác nhau đáng kể khi được dùng ở cùng một liều mol trong các điều kiện thử nghiệm tương tự, đơn liều hoặc nhiều liều. Một số kháng thể sẽ được cho là dạng tương đương hoặc dạng thay thế được phẩm nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ của chúng nhưng không tương đương về tốc độ hấp thụ và vẫn có thể được cho là dạng tương đương sinh học vì sự khác nhau này về tốc độ hấp thụ là có chủ ý và được phản chiếu khi đánh dấu, không nhất thiết đạt được các nồng độ được chất hữu hiệu trong cơ thể, ví dụ, khi sử dụng mạn tính, và được cho là có nghĩa về mặt y khoa đối với sản phẩm được chất cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là dạng tương đương sinh học nếu không có sự khác nhau đáng kể về mặt lâm sàng về tính an toàn, độ tinh khiết, hoặc hiệu lực của chúng.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là dạng tương đương sinh học nếu người bệnh có thể được chuyển đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ tác dụng bất lợi, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng về tính sinh miễn dịch hoặc tác dụng giảm, khi so với liệu pháp liên tục mà không có sự chuyển đổi này.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là dạng tương đương sinh học nếu chúng cùng hoạt động bởi cơ chế hoặc các cơ chế hoạt động chung đối với điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng, đến phạm vi mà các cơ chế như vậy đã biết.

Dạng tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và/hoặc *in vitro*. Biện pháp tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc các chất chuyển hoá của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch sinh học khác dưới dạng chức năng theo thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà đã được tương quan với và dự đoán theo cách đáng tin cậy về dữ liệu sinh khả dụng *in vivo* của người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác mà trong đó tác dụng được lý giải thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo dưới dạng chức năng theo thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng có kiểm soát mà thiết lập tính an toàn, hiệu quả, hoặc tính sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của sáng chế.

Các biến thể tương đương sinh học của các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo cấu trúc bởi, ví dụ, bằng cách tạo ra các thay thế gốc hoặc trình tự khác nhau hoặc tạo khuyết đoạn các gốc đầu cuối hoặc bên trong hoặc các trình tự không cần cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc cysteine không nhất thiết cho hoạt tính sinh học có thể được làm khuyết đoạn hoặc thay thế bằng axit amin khác để ngăn ngừa sự tạo ra các cầu disulfua liên phân tử không cần thiết hoặc không chính xác khi khôi phục đặc tính đã mất. Nói cách khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể kháng thể có các thay đổi axit amin, mà cải biến các đặc điểm glycosyl hoá của kháng thể, ví dụ, các đột biến mà loại trừ hoặc loại bỏ quá trình glycosyl hoá.

Kháng thể kháng LAG3 chứa biến thể Fc

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng LAG3 được đề xuất chứa miền Fc có một hoặc nhiều đột biến mà làm tăng cường hoặc làm giảm sự gắn kết của kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, ở độ pH axit so với độ pH trung hoà. Ví

dự, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LAG3 có đột biến trong vùng C_{H2} hoặc C_{H3} của miền Fc, trong đó (các) đột biến này làm tăng ái lực của miền Fc với $FcRn$ trong môi trường có tính axit (ví dụ, trong nội thể mà trong đó độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Các đột biến này có thể dẫn đến sự làm tăng nửa chu kỳ phân rã trong huyết thanh của kháng thể khi được dùng cho động vật. Các ví dụ không giới hạn về các biến đổi Fc này bao gồm, ví dụ, sự biến đổi ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T), và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc sự biến đổi ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, A, W, H, F hoặc Y [N434A, N434W, N434H, N434F hoặc N434Y]); hoặc sự biến đổi ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc sự biến đổi ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, sự biến đổi bao gồm sự biến đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); sự biến đổi 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); sự biến đổi 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); sự biến đổi 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); sự biến đổi 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và sự biến đổi 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P). Theo phương án khác nữa, sự biến đổi bao gồm sự biến đổi 265A (ví dụ, D265A) và/hoặc 297A (ví dụ, N297A).

Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 chứa miền Fc có một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm đột biến được chọn từ nhóm gồm có: 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L); 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E); 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); 257I và 311I (ví dụ, P257I và Q311I); 257I và 434H (ví dụ, P257I và N434H); 376V và 434H (ví dụ, D376V và N434H); 307A, 380A và 434A (ví dụ, T307A, E380A và N434A); và 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F). Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 chứa miền Fc có đột biến S108P trong vùng bản lề của IgG4 để thúc đẩy quá trình ổn định hoá dime. Tất cả các tổ hợp có thể xảy ra của các đột biến miền Fc ngoại và các đột biến khác nằm trong miền biến đổi kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này, có mục đích nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng LAG3 chứa vùng hằng định chuỗi nặng (C_H) khảm, trong đó vùng C_H khảm này bao gồm các đoạn có nguồn gốc từ vùng C_H của nhiều hơn một lớp kháng thể globulin miễn dịch. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm vùng C_H khảm bao gồm một phần hoặc tất cả miền C_{H2} có

nguồn gốc từ phân tử IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, được kết hợp với một phần hoặc tất cả miền C_H3 được tạo ra từ phân tử IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng C_H khảm có vùng bản lề khảm. Ví dụ, bản lề khảm có thể bao gồm trình tự axit amin "bản lề trên" (các gốc axit amin từ các vị trí 216 đến 227 theo cách đánh số EU) có nguồn gốc từ vùng bản lề IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, được kết hợp với trình tự "bản lề dưới" (các gốc axit amin từ các vị trí 228 đến 236 theo cách đánh số EU) có nguồn gốc từ vùng bản lề IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Theo các phương án nhất định, vùng bản lề khảm bao gồm các gốc axit amin có nguồn gốc từ bản lề trên IgG1 của người hoặc IgG4 của người và các gốc axit amin có nguồn gốc từ bản lề dưới IgG2 của người. Kháng thể bao gồm vùng C_H khảm như được mô tả trong bản mô tả này, theo các phương án nhất định, biểu lộ các chức năng phản ứng lại kích thích Fc được biến đổi mà không gây ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính trị liệu hoặc dược động học của kháng thể. (Xem, ví dụ, patent Mỹ số 20140243504, nội dung của patent Mỹ này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó). Theo các phương án nhất định, vùng Fc bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 569, 570, 571, 572 và 573.

Các đặc điểm sinh học của kháng thể

Nói chung, chức năng của các kháng thể theo sáng chế bằng cách gắn kết với LAG3. Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết các phân tử monome hoặc dime LAG3 có thể hoà tan với ái lực cao. Ví dụ, sáng chế đề cập đến các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể mà gắn kết LAG3 monome (ví dụ, ở 25°C hoặc ở 37°C) với K_D nhỏ hơn khoảng 10nM như đo được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết LAG3 monome với K_D nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 2nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, nhỏ hơn khoảng 0,5nM, nhỏ hơn khoảng 0,1nM, nhỏ hơn khoảng 0,05nM hoặc nhỏ hơn khoảng 0,04nM, như đo được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết LAG3 dime (ví dụ, ở 25°C hoặc ở 37°C) với K_D nhỏ hơn khoảng 1,1nM như đo được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết LAG3 dime với K_D nhỏ hơn khoảng 0,5nM, nhỏ hơn khoảng 0,25nM, nhỏ hơn khoảng 0,1nM, nhỏ hơn khoảng 0,05nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,01M, như xác định được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết LAG3 với chu kỳ nửa phân rã phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 1,6 phút như đo được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế gắn kết LAG3 với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 5 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 60 phút, lớn hơn khoảng 70 phút, lớn hơn khoảng 80 phút, lớn hơn khoảng 90 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, lớn hơn khoảng 200 phút, lớn hơn khoảng 300 phút, lớn hơn khoảng 400 phút, lớn hơn khoảng 500 phút, lớn hơn khoảng 600 phút, lớn hơn khoảng 700 phút, lớn hơn khoảng 800 phút, lớn hơn khoảng 900 phút, lớn hơn khoảng 1.000 phút, hoặc lớn hơn khoảng 1.100 phút, như đo được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này (ví dụ, dạng thu hút mAb hoặc dạng thu hút kháng nguyên), hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết với tế bào biểu hiện LAG3 của người với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 8nM như đo được bởi thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy như xác định được trong Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết với tế bào biểu hiện hLAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 2nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,5nM, như đo được bởi thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm trong Ví dụ 5 trong bản mô

tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết với tế bào biểu hiện LAG3 của khỉ cynomolgus với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,5nM như đo được bởi thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy như xác định được trong Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết với tế bào biểu hiện mLAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 2nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 1nM, như đo được bởi thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II (HLA-DR2 của người) với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 32nM như xác định được bằng cách sử dụng thử nghiệm kết dính tế bào, *ví dụ*, như được thể hiện trong Ví dụ 7 hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II của người với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 25nM, nhỏ hơn khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 5nM, như đo được bởi thử nghiệm kết dính tế bào, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 7 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II (HLA-DR2 của chuột) với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 30nM như xác định được bằng cách sử dụng thử nghiệm kết dính tế bào, *ví dụ*, như được thể hiện trong Ví dụ 7, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng phong bế sự gắn kết LAG3 của chuột nhất với MHC nhóm II của người với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 25nM, nhỏ hơn khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 5nM, như đo được bởi thử nghiệm kết dính tế bào, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 7 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của

nó mà phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II của người hoặc của chuột nhất nhiều hơn 90% như đo được bởi thử nghiệm kết dính tế bào như xác định được trong Ví dụ 7 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà phong bế sự điều hòa giảm tế bào T cảm ứng LAG với EC_{50} nhỏ hơn 9nM như đo được bởi thử nghiệm thông báo tế bào T/APC luxiferaza như xác định được trong Ví dụ 8 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng phong bế sự điều hòa giảm tế bào T do LAG3 gây ra với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, nhỏ hơn khoảng 0,5nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,1nM, như đo được bởi thử nghiệm thông báo tế bào T/APC luxiferaza, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 8 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết với tế bào T CD4+ và CD8+ được hoạt hoá của khỉ cynomolgus với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1,2nM như đo được bởi thử nghiệm huỳnh quang như xác định được trong Ví dụ 9 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết với tế bào T CD4+ và CD8+ được hoạt hoá của khỉ cynomolgus với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1,1nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, nhỏ hơn khoảng 0,5nM, nhỏ hơn khoảng 0,2nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,1nM, như đo được bởi thử nghiệm huỳnh quang, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như xác định được trong Ví dụ 9 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng bằng cách phong bế hoặc ức chế hoạt tính gắn kết của MHC nhóm II kết hợp với LAG3 bằng cách gắn kết với vùng hoặc mảnh khác bất kỳ của protein có chiều dài đầy đủ, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 582.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế là hữu ích trong việc ức chế sự phát triển của khối u hoặc làm trễ sự tiến triển của bệnh ung thư khi được dùng theo cách phòng bệnh cho đối tượng cần điều trị này và có thể làm tăng sự sống của đối tượng. Ví dụ, việc dùng kháng thể theo sáng chế có thể dẫn đến sự co

rút khối u nguyên phát và có thể ngăn không cho di căn hoặc phát triển khối u thứ cấp. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế là hữu ích để ức chế sự phát triển của khối u khi được dùng theo cách trị liệu cho đối tượng cần điều trị này và có thể làm tăng sự sống của đối tượng này. Ví dụ, việc dùng lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể theo sáng chế cho đối tượng có thể dẫn đến co rút và biến mất khối u đã được xác định ở đối tượng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng tái tổ hợp phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với LAG3, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó biểu hiện một hoặc nhiều đặc điểm sau: (i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 458, 466, 474, 482, 490, 498, 506, 514, 538, và 554, hoặc trình tự gần như tương đồng đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 522, 530, 546, và 562, hoặc trình tự gần như tương đồng đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 464, 472, 480, 488, 496, 504, 512, 520, 544, và 560, hoặc trình tự gần như tương đồng đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 528, 536, 552, và 568, hoặc trình tự gần như tương đồng đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iv) chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 460, 468, 476, 484, 492, 500, 508, 516, 540, và 556, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%

hoặc ít nhất 99%; miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 462, 470, 478, 486, 494, 502, 510, 518, 542, và 558, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 524, 532, 548, và 564, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 526, 534, 550, và 566, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (v) gắn kết LAG3 monome của người với hằng số cân bằng phân ly gắn kết (K_D) nhỏ hơn khoảng 10nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C; (vi) gắn kết LAG3 monome của người với K_D nhỏ hơn khoảng 8nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C; (vii) gắn kết LAG3 dime của người với K_D nhỏ hơn khoảng 1,1nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C; (viii) gắn kết LAG3 dime của người với K_D nhỏ hơn khoảng 1nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C; (ix) gắn kết với tế bào biểu hiện hLAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 8nM như đo được trong thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy; (x) gắn kết với tế bào biểu hiện mLAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,3nM như đo được trong thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy; (xi) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II của người với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 32nM như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào; (xii) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II của chuột nhắt với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 30nM như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào; (xiii) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II nhiều hơn 90% như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào; (xiv) phóng thích sự ức chế hoạt tính tế bào T qua trung gian LAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 9nM như xác định được trong thử nghiệm thông báo luxiferaza; (xv) gắn kết với tế bào T CD4+ và CD8+ được hoạt hoá với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1,2nM, như xác định được trong thử nghiệm huỳnh

quang; (xvi) ngăn chặn sự phát triển khối u và làm tăng sự sống ở đối tượng mắc bệnh ung thư và (xvii) là của người đầy đủ.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều đặc điểm sinh học nêu trên hoặc các tổ hợp bất kỳ của nó. Các đặc điểm sinh học khác của các kháng thể theo sáng chế sẽ hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa vào nội dung được bộc lộ của sáng chế bao gồm phần Ví dụ thực hiện sáng chế trong bản mô tả này.

Tính lựa chọn loài và phản ứng chéo giữa các loài

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng LAG3 gắn kết với LAG3 của người nhưng không gắn kết với LAG3 từ các loài khác. Theo cách khác, kháng thể kháng LAG3 của sáng chế, theo các phương án nhất định, gắn kết với LAG3 của người và với LAG3 từ một hoặc nhiều loài không phải người. Ví dụ, kháng thể kháng LAG3 của sáng chế có thể gắn kết với LAG3 của người và có thể gắn kết hoặc không gắn kết, như trường hợp có thể tồn tại, với một hoặc nhiều LAG3 của chuột cống, chuột nhắt, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ cynomolgus, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu hoặc tinh tinh. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế có thể gắn kết với LAG3 của người và của khỉ cynomolgus với cùng các ái lực hoặc với các ái lực khác nhau, nhưng không gắn kết với LAG3 của chuột cống và chuột nhắt.

Kỹ thuật lập bản đồ quyết định kháng nguyên và các kỹ thuật có liên quan

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin được tìm thấy trong một hoặc nhiều miền của phân tử LAG3 bao gồm, *ví dụ*, các miền ngoại bào D1 đến D4, miền xuyên màng, và miền nội bào. Quyết định kháng nguyên mà các kháng thể gắn kết có thể gồm có một trình tự kế tiếp chứa 3 axit amin hoặc nhiều hơn (*ví dụ*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) được nằm trong miền bất kỳ trong số các miền nêu trên của phân tử LAG3 (*ví dụ* quyết định kháng nguyên thẳng trong miền). Theo cách khác, quyết định kháng nguyên có thể gồm có nhiều axit amin không kế tiếp (hoặc các trình tự axit amin) nằm trong một hoặc cả hai miền nêu trên của phân tử LAG3 (*ví dụ* quyết định kháng nguyên cấu dạng).

Các kỹ thuật khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh

vực này có thể được sử dụng để xác định xem liệu kháng thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" trong polypeptit hoặc protein hay không. Các kỹ thuật làm ví dụ bao gồm, ví dụ, các thử nghiệm phong bế chéo thông thường, như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Các phương pháp khác bao gồm phân tích đột biến sàng lọc alanin, phân tích thẩm tách peptit (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), nghiên cứu tinh thể học phân tích phân cắt peptit và phân tích NMR. Ngoài ra, các phương pháp như cắt xén quyết định kháng nguyên, trích xuất quyết định kháng nguyên và biến đổi hoá học của các kháng nguyên có thể được dùng (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Phương pháp khác mà có thể được sử dụng để nhận biết các axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác là sự trao đổi hydro/đơteri được phát hiện bởi phép đo phổ khối. Trong các thuật ngữ nói chung, phương pháp trao đổi hydro/đơteri bao gồm đánh dấu đơteri protein được đề cập, tiếp theo là gắn kết kháng thể với protein được đánh dấu đơteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước và proton có thể trao đổi trong các axit amin mà được bảo vệ bởi phức hợp kháng thể trải qua sự trao đổi ngược đơteri-hydro ở tốc độ chậm hơn so với proton trao đổi được trong các axit amin mà không phải là một phần của bề mặt chung. Kết quả là, các axit amin mà tạo ra một phần của bề mặt chung protein/kháng thể có thể giữ lại đơteri và do đó thể hiện khối lượng tương đối cao hơn so với axit amin không có trong bề mặt chung. Sau khi phân ly kháng thể, protein đích được đưa vào phân cắt proteaza và phân tích phổ khối, nhờ đó biết được các gốc đánh dấu đơteri mà tương ứng với axit amin đặc hiệu mà kháng thể tương tác. Xem, ví dụ, tài liệu Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Thuật ngữ "quyết định kháng nguyên" dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc T đáp ứng. Các quyết định kháng nguyên tế bào B có thể được tạo ra cả từ axit amin kế tiếp hoặc axit amin không kế tiếp được đặt kề nhau bằng cách gấp bậc ba protein. Nói chung, các quyết định kháng nguyên được tạo ra từ axit amin kế tiếp được cho tiếp xúc với các dung môi biến tính, trong khi các quyết định kháng nguyên được tạo ra bằng cách gấp bậc ba nói chung bị mất khi xử lý với các dung môi biến tính. Nói chung, quyết định kháng nguyên bao gồm ít nhất 3, và thông thường hơn, ít nhất 5 hoặc từ 8 đến 10 axit amin trong cấu dạng không gian độc nhất.

Tạo hồ sơ trợ giúp cải biến (Modification-Assisted Profiling-MAP), còn được

gọi là tạo hồ sơ kháng thể trên cơ sở cấu trúc kháng nguyên (Antigen Structure-based Antibody Profiling-ASAP) là phương pháp mà phân loại số lượng lớn kháng thể đơn dòng (mAb) được định hướng kháng cùng một kháng nguyên theo các tính tương tự của hồ sơ gắn kết của mỗi kháng thể với bề mặt kháng nguyên được cải biến về mặt hoá học hoặc về mặt enzym (xem US 2004/0101920, nội dung của tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó). Mỗi loại có thể phản ánh một quyết định kháng nguyên độc nhất khác biệt với hoặc xếp chồng một phần với quyết định kháng nguyên được thể hiện bởi loại khác. Kỹ thuật này cho phép lọc nhanh chóng các kháng thể giống nhau về mặt di truyền, sao cho việc mô tả đặc điểm có thể được tập trung vào các kháng thể khác biệt về mặt di truyền. Khi được áp dụng cho việc sàng lọc thể lai, MAP có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc nhận biết các dòng thể lai hiếm mà tạo ra các mAb có các đặc điểm mong muốn. MAP có thể được sử dụng để phân loại các kháng thể theo sáng chế thành các nhóm kháng thể gắn kết các quyết định kháng nguyên khác nhau.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết quyết định kháng nguyên trong vùng bất kỳ hoặc nhiều vùng được lấy làm ví dụ trong LAG3, ở dạng tự nhiên, như được lấy làm ví dụ trong SEQ ID NO: 582, hoặc được tạo ra về mặt tái tổ hợp, như được lấy ví dụ trong SEQ ID NO: 574 đến 576, hoặc với mảnh của nó. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với vùng ngoại bào có một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm có các gốc axit amin 29 đến 450 của LAG3. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với vùng ngoại bào có một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm có các gốc axit amin 1 đến 533 của LAG3 của khỉ cynomolgus, như được minh hoạ bởi SEQ ID NO: 576.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với một hoặc nhiều quyết định kháng nguyên được tìm thấy trong vùng ngoại bào của LAG3 (SEQ ID NO: 588). (Các) quyết định kháng nguyên có thể gồm có một hoặc nhiều trình tự kế tiếp có 3 axit amin hoặc nhiều hơn (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) nằm trong vùng ngoại bào của LAG3. Theo cách khác, quyết định kháng nguyên có thể gồm có các axit amin không kế tiếp (hoặc trình tự axit amin) nằm trong vùng ngoại bào của LAG3. Như được thể hiện trong Ví dụ 18 trong bản mô tả

này, quyết định kháng nguyên của LAG3 mà kháng thể làm ví dụ theo sáng chế H4sH15482P tương tác được xác định bởi trình tự axit amin LRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 589), mà tương ứng với axit amin 28 đến 71 nêu trong SEQ ID NO: 588. Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin có trong vùng gồm có axit amin 28 đến 71 nêu trong SEQ ID NO: 588 (nghĩa là, trình tự LRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY [SEQ ID NO: 589]).

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 mà gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên, hoặc một phần của quyết định kháng nguyên, như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu làm ví dụ được mô tả trong bản mô tả này trong Bảng 1 hoặc kháng thể có các trình tự CDR của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể làm ví dụ được mô tả trong Bảng 1. Tương tự, sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng LAG3 mà cạnh tranh gắn kết với LAG3 hoặc mảnh LAG3 với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu làm ví dụ được mô tả trong bản mô tả này trong Bảng 1 hoặc kháng thể có các trình tự CDR của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể làm ví dụ được mô tả trong Bảng 1. Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LAG3 mà cạnh tranh chéo để gắn kết với LAG3 với một hoặc nhiều các kháng thể như xác định được trong Ví dụ 4 trong bản mô tả này (ví dụ, H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P, H4sH15498P, H4H15498P, H4H17828P2, H4H17819P, và H4H17823P).

Người ta có thể dễ xác định xem liệu kháng thể có gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên hoặc có cạnh tranh để gắn kết với, kháng thể kháng LAG3 tham chiếu hay không bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, để xác định nếu kháng thể thử nghiệm gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể kháng LAG3 tham chiếu của sáng chế, kháng thể tham chiếu được cho phép gắn kết với Protein LAG3 hoặc peptit LAG3 trong các điều kiện bão hoà. Tiếp theo, khả năng kháng thể thử nghiệm gắn kết với phân tử LAG3 được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có khả năng gắn kết với LAG3 sau khi gắn kết bão hoà với kháng thể kháng LAG3 tham chiếu, có thể kết luận được rằng kháng thể thử nghiệm gắn kết với quyết định kháng nguyên khác với kháng thể kháng LAG3 tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng gắn kết với

Protein LAG3 sau khi gắn kết bão hoà với kháng thể kháng LAG3 tham chiếu, thì sau đó kháng thể thử nghiệm có thể gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên như quyết định kháng nguyên được gắn kết bởi kháng thể kháng LAG3 tham chiếu theo sáng chế.

Để xác định nếu kháng thể cạnh tranh gắn kết với kháng thể kháng LAG3 tham chiếu, hệ phương pháp gắn kết được mô tả trên đây được thực hiện theo hai hướng: Theo hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được cho phép gắn kết với Protein LAG3 trong các điều kiện trung hoà tiể theo đánh giá sự gắn kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử LAG3. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được cho phép gắn kết với phân tử LAG3 trong các điều kiện trung hoà tiếp theo đánh giá sự gắn kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử LAG3. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ có kháng thể thử nhất (trung hoà) có khả năng gắn kết với phân tử LAG3, thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh gắn kết với LAG3. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng, kháng thể mà cạnh tranh gắn kết với kháng thể tham chiếu có thể không nhất thiết phải gắn kết với quyết định kháng nguyên giống như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể phong bế về mặt không gian sự gắn kết của kháng thể tham chiếu bằng cách gắn kết quyết định kháng nguyên xếp chồng hoặc liền kề.

Hai kháng thể gắn kết với cùng một quyết định kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên xếp chồng nếu mỗi kháng thể ức chế (phong bế) cạnh tranh sự gắn kết của kháng thể kia với kháng nguyên. Tức là, lượng dư gấp 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần một kháng thể ức chế sự gắn kết của kháng thể kia ít nhất 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí 99% như đo được trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh (xem, *ví dụ*, ấn phẩm: Junghans và cộng sự., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Theo cách khác, hai kháng thể có cùng một quyết định kháng nguyên nếu gần như tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc loại trừ sự gắn kết của một kháng thể làm giảm hoặc loại trừ sự gắn kết của kháng thể kia. Hai kháng thể có các quyết định kháng nguyên xếp chồng nếu một số đột biến axit amin mà làm giảm hoặc loại trừ sự gắn kết của một kháng thể làm giảm hoặc loại trừ sự gắn kết của kháng thể kia.

Tiếp theo, thử nghiệm thông thường bổ sung (*ví dụ*, đột biến peptit và phân tích gắn kết) có thể được thực hiện để xác nhận xem liệu việc thiếu sự gắn kết được quan sát của kháng thể thử nghiệm trong thực tế có phải do gắn kết với cùng một quyết định

kháng nguyên như kháng thể tham chiếu hay không hoặc nếu sự phong bế trong không gian (hoặc hiện tượng khác) có đáp ứng việc thiếu sự gắn kết được quan sát hay không. Các thử nghiệm phân loại này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ELISA, RIA, cộng hưởng plasmon bề mặt, phép đo số lượng tế bào theo dòng chảy hoặc thử nghiệm gắn kết kháng thể theo định lượng hoặc định tính khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Các liên hợp miễn dịch

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng LAG3 của người được liên hợp với gốc trị liệu (“thể liên hợp miễn dịch”), như chất gây độc tế bào hoặc chất hoá trị liệu để điều trị bệnh ung thư. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể liên hợp miễn dịch” dùng để chỉ kháng thể mà được liên kết về mặt hoá học hoặc về mặt sinh học với chất gây độc tế bào, chất phóng xạ, xytokin, interferon, gốc đích hoặc gốc thông báo, enzym, độc tố, peptit hoặc protein hoặc chất trị liệu. Kháng thể có thể được liên kết với chất gây độc tế bào, chất phóng xạ, xytokin, interferon, gốc đích hoặc gốc thông báo, enzym, độc tố, peptit hoặc chất trị liệu ở vị trí bất kỳ dọc theo phân tử miễn là nó có khả năng gắn kết với đích của nó. Các ví dụ về các thể liên hợp miễn dịch bao gồm các thể liên hợp được chất kháng thể và các protein dung hợp kháng thể-độc tố. Theo một phương án, chất này có thể là kháng thể kháng LAG3 thứ hai khác. Theo các phương án nhất định, kháng thể có thể được liên hợp với chất đặc hiệu với tế bào khối u hoặc tế bào nhiễm virus. Kiểu phân điều trị mà có thể được liên hợp với kháng thể kháng LAG3 và sẽ được xét đến trong tình trạng bệnh cần điều trị và tác dụng trị liệu mong muốn sẽ đạt được. Đã biết các ví dụ về các chất thích hợp để tạo ra các thể liên hợp miễn dịch trong lĩnh vực này; xem ví dụ, công bố quốc tế số WO 05/103081.

Kháng thể đa đặc hiệu

Các kháng thể theo sáng chế có thể là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép, hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu đối với các quyết định kháng nguyên khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với nhiều hơn một polypeptit đích. Xem, *ví dụ*, tài liệu Tutt và cộng sự., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer và cộng sự., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng trong đó một độ đặc hiệu của globulin miễn dịch đặc hiệu đối với miền ngoại bào của LAG3, hoặc mảnh của nó, và độ đặc hiệu kia của globulin miễn dịch đặc hiệu với sự gắn kết bên ngoài miền ngoại bào của LAG3, hoặc đích trị liệu thứ hai, hoặc được liên hợp với gốc trị liệu.

Phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu theo sáng chế hoặc các biến thể của nó, có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn (ví dụ, kỹ thuật ADN tái tổ hợp và biểu hiện protein), như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Theo một số phương án, các kháng thể đặc hiệu LAG3 được tạo ra ở dạng đặc hiệu kép ("đặc hiệu kép") trong đó các vùng biến đổi gắn kết với các miền khác nhau của LAG3 được liên kết với nhau để tạo ra độ đặc hiệu miền kép trong một phân tử gắn kết. Các độ đặc hiệu kép được thiết kế thích hợp có thể làm tăng cường hiệu quả ức chế tổng thể LAG3 thông qua việc làm tăng cả độ đặc hiệu và ái lực gắn kết. Các vùng biến đổi với độ đặc hiệu đối với các miền riêng rẽ, (ví dụ, các đoạn của miền đầu N) hoặc mà có thể gắn kết với các vùng khác nhau trong một miền, được ghép cặp trên khung cấu trúc mà cho phép mỗi vùng gắn kết đồng thời với các quyết định kháng nguyên riêng biệt hoặc với các vùng khác nhau trong một miền. Trong một ví dụ về đặc hiệu kép, vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) từ phần gắn kết với độ đặc hiệu trong một miền được tái tổ hợp với các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) từ các phần gắn kết với độ đặc hiệu đối với miền thứ hai để nhận biết các đối tác V_L không cùng nguồn gốc mà có thể được ghép cặp với V_H mà không gây gián đoạn độ đặc hiệu ban đầu đối với V_H đó. Theo cách này, một đoạn V_L (ví dụ, V_{L1}) có thể được kết hợp với hai miền V_H khác nhau (ví dụ, V_{H1} và V_{H2}) để tạo ra đặc hiệu kép gồm có hai "nhánh" gắn kết (V_{H1} - V_{L1} và V_{H2} - V_{L1}). Việc sử dụng một đoạn V_L làm giảm tính phức tạp của hệ thống và nhờ đó đơn giản hoá và làm tăng hiệu quả trong các quy trình tạo dòng, biểu hiện, và tinh chế được sử dụng để tạo ra đặc hiệu kép (xem, ví dụ, USSN13/022759 và US2010/0331527).

Theo cách khác, các kháng thể mà gắn kết nhiều hơn một miền và đích thứ hai, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, kháng thể kháng LAG3 thứ hai khác, có thể được tạo ra ở dạng đặc hiệu kép bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các kỹ thuật khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong

lĩnh vực này. Các vùng biến đổi của kháng thể gắn kết với các vùng khác nhau có thể được liên kết với nhau với các vùng biến đổi mà gắn kết với các vị trí liên quan trên, ví dụ, miền ngoại bào của LAG3, để tạo ra độ đặc hiệu kháng nguyên kép trong một phân tử gắn kết. Các đặc hiệu kép được thiết kế thích hợp có bản chất này dùng làm chức năng kép. Các vùng biến đổi với độ đặc hiệu đối với miền ngoại bào được kết hợp với vùng biến đổi với độ đặc hiệu đối với miền ngoại bào bên ngoài và được ghép cặp trên khung cấu trúc mà cho phép mỗi vùng biến đổi gắn kết với các kháng nguyên riêng biệt.

Dạng kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm sử dụng miền globulin miễn dịch (Ig) C_H3 thứ nhất và miền Ig C_H3 thứ hai, trong đó các miền Ig C_H3 thứ nhất và thứ hai khác nhau bởi ít nhất một axit amin và trong đó ít nhất một sự khác nhau về axit amin làm giảm sự gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với Protein A khi so với kháng thể đặc hiệu kép thiếu sự khác nhau về axit amin. Theo một phương án, miền Ig C_H3 thứ nhất gắn kết Protein A và miền Ig C_H3 thứ hai chứa đột biến mà làm giảm hoặc huỷ bỏ sự gắn kết Protein A như biến đổi H95R (bởi cách đánh số IMGT exon; H435R bởi cách đánh số EU). C_H3 thứ hai còn có thể bao gồm đột biến Y96F (bởi IMGT; Y436F bởi EU). Các cải biến khác mà có thể được tìm thấy trong C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (bởi IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I bởi EU) trong trường hợp các kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I bởi EU) trong trường hợp các kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (bởi IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I bởi EU) trong trường hợp các kháng thể IgG4. Các biến thể trên dạng kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trên đây được dự định nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Các dạng đặc hiệu kép làm ví dụ khác mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn, *ví dụ*, các dạng đặc hiệu kép trên cơ sở scFv hoặc diabody, thể dung hợp IgG-scFv, miền biến đổi kép (DVD)-Ig, Quadroma, nút bấm vào trong lỗ, chuỗi nhẹ thông thường (*ví dụ*, chuỗi nhẹ thông thường với nút bấm vào trong lỗ, v.v), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, khoá kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác dụng kép và các dạng đặc hiệu kép Mab² (*xem, ví dụ*, tài liệu Klein và cộng sự. 2012, mAbs 4:6, 1-11, và tài liệu tham chiếu được trích

dẫn trong bản mô tả này, nhằm mục đích xem xét các dạng nêu trên). Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng thể liên hợp peptit/axit nucleic, *ví dụ*, trong đó axit amin không tự nhiên với khả năng phản ứng hoá học trực giao được sử dụng để tạo ra các thể liên hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu vị trí mà tiếp theo tự lắp ráp thành các phức hợp multimer với chế phẩm, hoá trị và dạng hình học được xác định. (xem, *ví dụ*, tài liệu Kazane và cộng sự, *J. Am. Chem. Soc.* [xuất bản điện tử ngày 4 tháng Mười Hai năm 2012]).

Cách dùng trị liệu và dược phẩm

Sáng chế đề xuất dược phẩm trị liệu chứa kháng thể kháng LAG3 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Dược phẩm trị liệu theo sáng chế sẽ được dùng với các chất mang, tá dược, và các chất khác thích hợp mà được đưa vào trong dược phẩm để tạo ra sự vận chuyển, phân phối, sự dung nạp, và các dạng tương tự được cải thiện. Nhiều dược phẩm thích hợp có thể được tìm thấy ở dạng đã biết đối với tất cả ngành hoá dược phẩm: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dược phẩm này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, keo đông, sáp, dầu, lipit, túi chứa lipit (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™), thể liên hợp ADN, bột nhão hấp thụ dạng khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, nhũ tương cacbovac (polyetylen glycol có các trọng lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa cacbovac. Cũng xem tài liệu Powell và cộng sự "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

Liều kháng thể có thể thay đổi phụ thuộc vào tuổi và kích cỡ của đối tượng cần được dùng, bệnh đích, tình trạng bệnh, đường dùng, và các dạng tương tự. Khi kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở người bệnh trưởng thành, hoặc để ngăn ngừa bệnh này, có ưu điểm là dùng kháng thể theo sáng chế thường ở liều đơn nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 60, khoảng từ 20 đến 50, khoảng từ 10 đến 50, khoảng từ 1 đến 10, hoặc khoảng từ 0,8 đến 11mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức trầm trọng của tình trạng bệnh, tần suất và khoảng thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được dùng dưới dạng liều ban đầu ít nhất nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 800mg, khoảng từ 1 đến 500 mg, khoảng từ 5 đến 300mg, hoặc khoảng từ 10 đến

200mg, đến khoảng 100mg, hoặc đến khoảng 50mg. Theo các phương án nhất định, liều ban đầu có thể được tiếp theo dùng liều thứ hai hoặc các liều tiếp theo của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó với lượng mà có thể gần như giống hoặc nhỏ hơn lượng liều ban đầu, trong đó các liều tiếp theo được phân cách bởi ít nhất 1 ngày đến 3 ngày; ít nhất một tuần, ít nhất 2 tuần; ít nhất 3 tuần; ít nhất 4 tuần; ít nhất 5 tuần; ít nhất 6 tuần; ít nhất 7 tuần; ít nhất 8 tuần; ít nhất 9 tuần; ít nhất 10 tuần; ít nhất 12 tuần; hoặc ít nhất 14 tuần.

Đã biết các hệ phân phối khác nhau và có thể được sử dụng để dùng dược phẩm theo sáng chế, *ví dụ*, bao nang trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện các virus đột biến, nhập lại tế bào qua trung gian thụ thể (xem, *ví dụ*, tài liệu Wu và cộng sự (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Các phương pháp đưa vào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường trong da, qua da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, qua màng cứng và qua đường miệng. Dược phẩm có thể được dùng theo đường thông thường bất kỳ, *ví dụ* bằng quá trình truyền hoặc tiêm liều cao, bằng sự hấp thụ qua lớp biểu mô hoặc niêm mạc da (*ví dụ*, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, v.v.) và có thể được dùng cùng với các chất có hoạt tính sinh học khác. Việc dùng có thể là dùng hệ thống hoặc dùng tại chỗ. Dược phẩm cũng có thể được phân phối trong túi, cụ thể là liposom (xem, *ví dụ*, tài liệu Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Việc sử dụng hạt nano để phân phối các kháng thể theo sáng chế cũng được dự định trong bản mô tả này. Các hạt nano được liên hợp kháng thể có thể được sử dụng cả cho ứng dụng trị liệu và chẩn đoán. Các hạt nano được liên hợp kháng thể và phương pháp bào chế và sử dụng được mô tả chi tiết trong tài liệu Arruebo, M., và cộng sự 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 trang, doi: 10.1155/2009/439389), nội dung của tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Hạt nano có thể được phát triển và được liên hợp với các kháng thể có trong dược phẩm để nhắm trúng đích tế bào khối u hoặc tế bào mô tự miễn dịch hoặc tế bào nhiễm virus. Các hạt nano dùng để phân phối dược chất cũng đã được mô tả, *ví dụ*, trong patent Mỹ số US 8257740, hoặc US 8246995, mỗi tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó.

Trong các trường hợp nhất định, dược phẩm có thể được phân phối trong hệ

giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bom có thể được sử dụng. Theo phương án khác, các nguyên liệu polyme có thể được sử dụng. Theo phương án khác nữa, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt gần đích được phẩm, do đó chỉ cần dùng một phần liều toàn thân.

Dược phẩm tiêm được có thể bao gồm các dạng liều để dùng theo đường trong tĩnh mạch, dưới da, trong da, trong sọ, trong màng bụng và tiêm trong cơ, truyền nhỏ giọt, v.v.. Các dược phẩm tiêm được này có thể được điều chế bởi các phương pháp đã biết phổ biến. Ví dụ, dược phẩm tiêm được có thể được điều chế, *ví dụ*, bằng cách hoà tan, tạo huyền phù hoặc tạo nhũ tương kháng thể hoặc muối của nó được mô tả ở trên trong môi trường chứa nước vô trùng hoặc môi trường dạng dầu thường được dùng để tiêm. Là môi trường chứa nước dùng để tiêm, ví dụ, có nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và các chất bổ trợ khác, v.v., mà có thể được sử dụng kết hợp với chất hoà tan thích hợp như rượu (*ví dụ*, etanol), rượu đa chức (*ví dụ*, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion [*ví dụ*, polysorbat 80, sản phẩm cộng HCO-50 (polyoxyetylen (50mol) của dầu thầu dầu được hydro hoá)], v.v.. Là môi trường dạng dầu, ví dụ, đã dùng dầu vừng, dầu đậu nành, v.v., mà có thể được sử dụng kết hợp với chất hoà tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v.. Do đó, tốt hơn là dung dịch tiêm được tạo ra được nạp vào ống thuốc tiêm thích hợp.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối theo đường dưới da hoặc trong tĩnh mạch với kim và ống tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, tương đối với hệ phân phối dưới da, sẵn có thiết bị phân phối dạng bút có ứng dụng phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng bút này có thể sử dụng lại được hoặc dùng một lần. Nói chung, thiết bị phân phối dạng bút sử dụng lại được sử dụng hợp thay thế được mà chứa dược phẩm. Một khi tất cả dược phẩm trong hộp đã được dùng và hộp này trở nên trống rỗng, hộp trống rỗng này có thể dễ được thải và được thay thế bằng hộp mới mà chứa dược phẩm. Tiếp theo, thiết bị phân phối dạng bút có thể được sử dụng lại. Trong thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần, không có hộp nào thay thế được. Tốt hơn là, thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần được nạp trước với dược phẩm được giữ trong khoang chứa trong thiết bị. Một khi khoang này trở nên hết dược phẩm, thì toàn bộ thiết bị được xả thải.

Nhiều thiết bị phân phối dạng bút dùng lại được và tự tiêm có các ứng dụng trong phân phối dưới da dược phẩm theo sáng chế. Các ví dụ bao gồm, nhưng không

chỉ giới hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly và Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPĐÀUEN™, OPĐÀUEN PRO™, OPĐÀUEN STARLET™, và OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), danh mục này chỉ kể đến một số thiết bị. Các ví dụ về thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần có các ứng dụng phân phối dưới da được phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bút SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), thiết bị tiêm tự động SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), danh mục này chỉ kể đến một số thiết bị.

Có lợi là, được phẩm để dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hoá được mô tả trên đây được bào chế ở các dạng liều trong liều đơn vị thích hợp để làm phù hợp liều có các thành phần hoạt tính. Các dạng liều này trong liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, viên tròn, viên nang, dung dịch tiêm (ống thuốc tiêm), thuốc đạn, v.v.. Lượng kháng thể có trong đó thường nằm trong khoảng từ 5 đến 500mg trên mỗi dạng liều trong liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng tiêm, được ưu tiên là kháng thể có với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg và khoảng từ 10 đến 250mg đối với các dạng liều khác.

Sử dụng các kháng thể trong trị liệu

Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích, *không kể các tác dụng khác*, để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn bất kỳ kết hợp với hoặc qua trung gian bởi sự biểu hiện LAG3, truyền tín hiệu hoặc hoạt tính, hoặc có thể điều trị được bằng cách phong bế sự tương tác giữa LAG3 và phối tử LAG3 MHC nhóm II hoặc mặt khác ức chế hoạt tính và/hoặc truyền tín hiệu LAG3. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư (ức chế sự phát triển của khối u) và/hoặc nhiễm virus bằng cách cho người bệnh cần điều trị này dùng kháng thể kháng LAG3 (hoặc được phẩm chứa kháng thể kháng LAG3) như được mô tả trong bản mô tả này, và kháng thể kháng LAG3 (hoặc được phẩm chứa kháng thể kháng LAG3) để sử dụng

trong điều trị bệnh ung thư (ức chế sự phát triển của khối u) và/hoặc nhiễm virus. Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích để điều trị, ngăn ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh như bệnh ung thư hoặc nhiễm virus và/hoặc làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh. Trong phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể kháng LAG3 có thể được dùng dưới dạng liệu pháp đơn (nghĩa là, dưới dạng chỉ có chất điều trị) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung (các ví dụ của nó cũng được mô tả trong bản mô tả này).

Theo một số phương án của sáng chế, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này là hữu ích để điều trị các đối tượng mắc bệnh ung thư nguyên phát hoặc tái phát, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng), ung thư biểu mô tế bào thận (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô tế bào sáng), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú âm tính bộ ba), bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, bệnh ung thư đại trực tràng, u trung biểu mô, và bệnh ung thư da.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh ung thư máu” bao gồm bệnh máu ác tính mà ảnh hưởng đến máu, tủy xương, bạch huyết hoặc hệ bạch huyết. Do đó, thuật ngữ này bao gồm bệnh ác tính tế bào từ các dòng tế bào lympho và dạng tủy. Dòng tế bào tủy thường tạo ra bạch cầu hạt, hồng cầu, tiểu cầu, đại thực bào, và dưỡng bào; dòng tế bào lympho tạo ra B, T, NK và tế bào huyết tương. Do đó, thuật ngữ này bao gồm các bệnh ác tính tế bào nêu trên, tức là u lympho, u tủy, ung thư bạch cầu lympho và ung thư bạch cầu tủy. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu tủy cấp tính, bệnh bạch cầu lympho mạn tính, bệnh bạch cầu tủy mạn tính, bệnh bạch cầu đơn nhân cấp tính, u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin (ví dụ, u lympho tế bào B, u lympho tế bào B lớn khuếch tán), và u tủy (bao gồm đa u tủy).

Các kháng thể có thể được sử dụng để điều trị các triệu chứng giai đoạn sớm hoặc giai đoạn muộn của bệnh ung thư. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư giai đoạn tiến triển hoặc bệnh ung thư di căn. Các kháng thể là hữu ích trong việc làm giảm hoặc ức chế

hoặc co rút sự phát triển của khối u cả khối u rắn và bệnh ung thư máu. Theo các phương án nhất định, việc điều trị bằng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế dẫn đến sự hồi quy nhiều hơn 40%, sự hồi quy nhiều hơn 50%, sự hồi quy nhiều hơn 60%, sự hồi quy nhiều hơn 70%, sự hồi quy nhiều hơn 80% hoặc sự hồi quy nhiều hơn 90% khối u ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, các kháng thể có thể được sử dụng để ngăn ngừa sự tái phát khối u. Theo các phương án nhất định, các kháng thể là hữu ích trong việc kéo dài sự sống không tiến triển hoặc sự sống tổng thể ở đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, các kháng thể là hữu ích trong việc làm giảm độc tố do hoá trị liệu hoặc liệu pháp phóng xạ trong khi vẫn duy trì sự sống kéo dài ở người bệnh mắc bệnh ung thư.

Theo các phương án nhất định, đối tượng là người bệnh mắc bệnh ung thư, và là người:

- đã không nhận liệu pháp trị liệu trước bằng kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nhưng là ứng viên thích hợp để nhận liệu pháp trên cơ sở kháng thể kháng PD-1; và/hoặc
- đã nhận liệu pháp trên cơ sở kháng thể kháng PD-1/PD-L1 trước và có đáp ứng đối tượng được xác nhận (CR hoặc PR) hoặc SD trong ít nhất 3 tháng đối với liệu pháp kháng PD-1/PD-L1 nhưng sau đó tiến triển đối với liệu pháp đó hoặc có SD hoặc PR dưới dạng đáp ứng tốt nhất với đáp ứng ổn định tiếp theo trong 6 tháng; và/hoặc
- không phải là ứng viên cho liệu pháp tiêu chuẩn, hoặc đối với người mà không có liệu pháp sẵn có nào được mong đợi để tạo ra lợi ích lâm sàng và thích hợp đối với liệu pháp đơn mAb1; và/hoặc
- mắc giai đoạn nguyên thể kháng PD-1/PD-L1 IIIB hoặc IV NSCLC mà không có liệu pháp trước đối với bệnh di căn hoặc với sự tiến triển/tái phát bệnh sau một chế độ chứa platin; và/hoặc
- mắc giai đoạn bị kháng PD-1/PD-L1 IIB hoặc IV NSCLC không có nhiều hơn hai liệu pháp trước đối với bệnh di căn; và/hoặc

- mắc ccRCC tiến triển hoặc di căn nguyên thể kháng PD-1/PD-L1 với thành phần tế bào sáng mà đã nhận 1 đến 2 chế độ trước của liệu pháp kháng tạo mạch; và/hoặc
- mắc ccRCC tiến triển hoặc di căn ở giai đoạn bị kháng PD-1/PD-L1 với thành phần tế bào sáng mà đã nhận 1 đến 2 chế độ trước của liệu pháp kháng tạo mạch; và/hoặc
- mắc TNBC di căn nguyên thể kháng PD-1/PD-L1 (estrogen, progesteron và thụ thể yếu tố phát triển biểu bì của người âm tính 2) mà đã nhận 5 dòng liệu pháp trước hoặc ít hơn; và/hoặc
- mắc khối u hắc tố tiến triển hoặc di căn bị kháng PD-1/PD-L1 mà đã nhận không nhiều hơn 2 chế độ trước đối với bệnh di căn; và/hoặc
- mắc khối u hắc tố tiến triển hoặc di căn bị kháng PD-1/PD-L1 mà đã nhận không nhiều hơn 2 chế độ trước đối với bệnh di căn; và/hoặc
- mắc DLBCL tái phát/khó chữa nguyên thể kháng PD-1/PD-L1 mà đã tiến triển sau hoặc không phải là ứng viên để cấy ghép tế bào gốc tự rưng; và/hoặc
- mắc DLBCL tái phát/khó chữa bị kháng PD-1/PD-L1 mà đã tiến triển sau hoặc không phải là ứng viên để cấy ghép tế bào gốc tự rưng.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế là hữu ích để điều trị đối tượng bị nhiễm virus mạn tính. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế là hữu ích để làm giảm các độ chuẩn virus ở vật chủ và/hoặc phóng thích tế bào T bị làm kiệt. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị sự nhiễm virus mạn tính bởi virus gây bệnh viêm màng não-màng nhện tăng tế bào lympho (LCMV). Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được dùng với liệu trị liệu cho người bệnh bị nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) hoặc virus gây u nhú ở người (HPV) hoặc virus viêm gan B/C (HBV/HCV). Theo phương án có liên

quan, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị sự nhiễm bởi virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV) ở đối tượng khỉ như khỉ cynomolgus.

Theo các phương án nhất định, kháng thể phong bế của sáng chế có thể được dùng với lượng có hiệu quả trị liệu cho đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc nhiễm virus.

Một hoặc nhiều các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng để làm dịu hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm mức trầm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng hoặc tình trạng bệnh hoặc rối loạn.

Cũng được dự định trong bản mô tả này là để sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế theo cách phòng ngừa cho người bệnh có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư và nhiễm virus.

Theo phương án khác của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều chế được phẩm để điều trị người bệnh mắc bệnh ung thư, hoặc nhiễm virus. Theo phương án khác của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng làm liệu pháp bổ sung với chất khác bất kỳ hoặc liệu pháp khác bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hữu ích để điều trị bệnh ung thư hoặc nhiễm virus.

Liệu pháp kết hợp và được phẩm

Các liệu pháp kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế và chất trị liệu bổ sung bất kỳ mà có thể có lợi được kết hợp với kháng thể theo sáng chế hoặc với mảnh kháng thể có hoạt tính sinh học theo sáng chế.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp hiệp đồng với một hoặc nhiều được chất chống ung thư hoặc liệu pháp được sử dụng để điều trị hoặc ức chế bệnh ung thư bao gồm, ví dụ, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não (*ví dụ*, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng), ung thư biểu mô tế bào thận, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, bệnh ung thư đại trực tràng, u trung biểu mô, và bệnh ung thư da. Có mục đích trong bản mô tả này là để sử dụng kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế kết hợp với các liệu pháp kích thích miễn

dịch và/hoặc trợ giúp miễn dịch để ức chế sự phát triển của khối u, và/hoặc làm tăng sự sống của người bệnh mắc bệnh ung thư. Các liệu pháp kích thích miễn dịch bao gồm các liệu pháp kích thích miễn dịch trực tiếp để làm tăng hoạt tính của tế bào miễn dịch bởi “sự nhả phanh” trên tế bào miễn dịch được ngăn chặn hoặc “bước trên khi” để hoạt hoá đáp ứng miễn dịch. Các ví dụ bao gồm việc nhắm trúng đích các thụ thể điểm kiểm tra khác, dùng vaccin và chất bổ trợ. Các phương thức trợ giúp miễn dịch có thể làm tăng tính kháng nguyên của khối u bằng cách thúc đẩy sự chết tế bào miễn dịch, gây viêm hoặc các tác dụng gián tiếp khác mà thúc đẩy đáp ứng miễn dịch kháng khối u. Các ví dụ bao gồm bức xạ, hoá trị liệu, chất chống tạo thành mạch, và phẫu thuật.

Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, BGB-A317 hoặc REGN2810), chất ức chế PD-L1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-L1 như avelumab, atezolizumab, durvalumab, MDX-1105, hoặc REGN3504), chất ức chế CTLA-4 (ví dụ, ipilimumab), chất ức chế TIM3, chất ức chế BTLA, chất ức chế TIGIT, chất ức chế CD47, chất ức chế GITR, chất đối kháng của chất đồng ức chế tế bào T khác hoặc phối tử (ví dụ, kháng thể kháng CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 hoặc VISTA), chất ức chế indoleamin-2,3-dioxygenaza (IDO), chất đối kháng yếu tố phát triển nội mô mạch (VEGF) [ví dụ, “VEGF-Trap” như aflibercept hoặc protein dung hợp ức chế VEGF khác như được nêu trong patent Mỹ số US 7,087,411, hoặc kháng thể kháng VEGF hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ, bevacizumab, hoặc ranibizumab) hoặc chất ức chế kinaza phân tử nhỏ của thụ thể VEGF (ví dụ, sunitinib, sorafenib, hoặc pazopanib)], chất ức chế Ang2 (ví dụ, nesvacumab), chất ức chế yếu tố beta phát triển biến nạp (TGF β), chất ức chế thụ thể yếu tố phát triển biểu bì (EGFR) (ví dụ, erlotinib, cetuximab), chất ức chế CD20 (ví dụ, kháng thể kháng CD20 như rituximab), kháng thể kháng kháng nguyên đặc hiệu khối u [ví dụ, CA9, CA125, kháng nguyên liên quan đến khối u hắc tố 3 (MAGE3), kháng nguyên ung thư biểu mô phôi (CEA), vimentin, khối u-M2-PK, kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt (PSA), muxin-1, MART-1, và CA19-9], vaccin (ví dụ, Bacillus Calmette-Guerin, vaccin phòng ung thư), tá dược làm tăng sự biểu hiện kháng nguyên (ví dụ, yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-đại thực bào), kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép CD3xCD20 hoặc kháng thể đặc hiệu kép PSMAxCD3), chất gây độc tế bào, chất hoá trị liệu (ví dụ,

dacarbazin, temozolomit, xyclophosphamit, docetaxel, doxorubixin, daunorubixin, cisplatin, carboplatin, gemcitabin, methotrexat, mitoxantron, oxaliplatin, paclitaxel, và vincristin), xyclophosphamit, liệu pháp phóng xạ, chất ức chế IL-6R (ví dụ, sarilumab), chất ức chế IL-4R (ví dụ, dupilumab), chất ức chế IL-10, xytokin như IL-2, IL-7, IL-21, và IL-15, thể liên hợp kháng thể-độc chất (ADC) (ví dụ, kháng thể kháng CD19-DM4 ADC và kháng thể kháng DS6-DM4 ADC), dược chất chống viêm (ví dụ, corticosteroid và dược chất chống viêm không steroid), chất bổ sung khẩu phần ăn như chất chống oxy hoá hoặc liệu pháp khác bất kỳ để điều trị bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các vaccin phòng ung thư bao gồm vaccin tế bào có tua, virus diệt khối u, vaccin tế bào khối u, v.v. để làm tăng đáp ứng kháng khối u. Các ví dụ về vaccin phòng ung thư mà có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế bao gồm vaccin MAGE3 dùng cho khối u hắc tố và bệnh ung thư bàng quang, vaccin MUC1 dùng cho bệnh ung thư vú, EGFRv3 (ví dụ, Rindopepimut) dùng cho bệnh ung thư não (bao gồm u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng nhiều dạng), hoặc ALVAC-CEA (dùng cho bệnh ung thư CEA+).

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với liệu pháp phóng xạ trong các phương pháp tạo ra các đáp ứng kháng khối u trong khoảng thời gian kéo dài và/hoặc làm tăng sự sống của người bệnh mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế có thể được dùng trước, đồng thời hoặc sau khi dùng liệu pháp phóng xạ cho người bệnh mắc bệnh ung thư. Ví dụ, liệu pháp phóng xạ có thể được dùng theo một hoặc nhiều liều để làm thương tổn khối u sau khi dùng một hoặc nhiều liều kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Theo một số phương án, liệu pháp phóng xạ có thể được dùng tại chỗ để làm thương tổn khối u để làm tăng cường tính sinh miễn dịch cục bộ của khối u người bệnh (phóng xạ hỗ trợ) và/hoặc giết tế bào khối u (phóng xạ cắt bỏ) tiếp theo dùng toàn thân kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Ví dụ, phóng xạ trong sọ có thể được dùng cho người bệnh mắc bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng) kết hợp với việc dùng toàn thân kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với liệu pháp phóng xạ và chất hoá trị liệu (ví dụ, temozolomit) hoặc chất đối kháng VEGF (ví dụ, aflibercept).

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều dược chất kháng virus để điều trị nhiễm virus mạn tính do LCMV, HIV, HPV, HBV hoặc HCV gây ra. Các ví dụ về dược chất kháng virus bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, zidovudin, lamivudin, abacavir, ribavirin, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirin và corticosteroid.

(Các) chất/(các) thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được dùng trước, đồng thời, hoặc sau khi dùng kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Đối với các mục đích của sáng chế, các chế độ dùng này được xem là dùng kháng thể kháng LAG3 “kết hợp với” thành phần có hoạt tính trị liệu thứ hai.

(Các) thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được dùng cho đối tượng trước khi dùng kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Ví dụ, thành phần thứ nhất có thể được cho dùng "trước" thành phần thứ hai nếu thành phần thứ nhất được dùng 1 tuần trước, 72 giờ trước, 60 giờ trước, 48 giờ trước, 36 giờ trước, 24 giờ trước, 12 giờ trước, 6 giờ trước, 5 giờ trước, 4 giờ trước, 3 giờ trước, 2 giờ trước, 1 giờ trước, 30 phút trước, 15 phút trước, 10 phút trước, 5 phút trước hoặc ít hơn 1 phút trước khi dùng thành phần thứ hai. Theo các phương án khác, (các) thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được dùng cho đối tượng sau khi dùng kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Ví dụ, thành phần thứ nhất có thể được cho dùng "sau" thành phần thứ hai nếu thành phần thứ nhất được dùng 1 phút sau, 5 phút sau, 10 phút sau, 15 phút sau, 30 phút sau, 1 giờ sau, 2 giờ sau, 3 giờ sau, 4 giờ sau, 5 giờ sau, 6 giờ sau, 12 giờ sau, 24 giờ sau, 36 giờ sau, 48 giờ sau, 60 giờ sau, 72 giờ sau khi dùng thành phần thứ hai. Theo phương án khác nữa, (các) thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được dùng cho đối tượng đồng thời với việc dùng kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Việc dùng "đồng thời", đối với mục đích của sáng chế, bao gồm, *ví dụ*, dùng kháng thể kháng LAG3 và thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung cho đối tượng ở dạng liều đơn (*ví dụ*, cùng được bào chế), hoặc ở các dạng liều riêng biệt được dùng cho đối tượng trong khoảng 30 phút hoặc ít hơn với nhau. Nếu được dùng ở các dạng liều riêng biệt, mỗi dạng liều có thể được dùng qua cùng một đường (*ví dụ*, cả kháng thể kháng LAG3 và thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được dùng trong tĩnh mạch, dưới da, v.v.); theo cách khác, mỗi dạng liều có thể được dùng qua đường khác nhau (*ví dụ*, kháng thể kháng LAG3 có thể được dùng theo đường trong tĩnh mạch, và thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được dùng dưới da). Theo phương án khác, việc

dùng các thành phần ở dạng liều đơn, ở dạng liều riêng biệt bởi cùng một đường hoặc các dạng liều riêng biệt bởi các đường khác nhau tất cả được cho là "dùng đồng thời", đối với mục đích của sáng chế. Đối với mục đích của sáng chế, việc dùng kháng thể kháng LAG3 "trước", "đồng thời với", hoặc "sau" (như các thuật ngữ được xác định trên đây trong bản mô tả này) khi dùng thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung được cho là dùng kháng thể kháng LAG3 "kết hợp với" thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung).

Sáng chế đề cập đến được phẩm trong đó kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế được đồng bào chế với một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung như được mô tả trong bản mô tả này bằng cách sử dụng các tổ hợp liều.

Theo các phương án làm ví dụ trong đó kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế được dùng kết hợp với chất ức chế PD-1 (*ví dụ*, kháng thể kháng PD-1 như được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2015/0203579, được kết vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó), bao gồm việc dùng đồng được phẩm chứa kháng thể kháng LAG3 và chất ức chế PD-1, các thành phần đơn lẻ có thể được dùng cho đối tượng và/hoặc đồng bào chế bằng cách sử dụng nhiều tổ hợp liều. Do đó, sáng chế đề cập đến tổ hợp của (i) kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế, và (ii) chất ức chế PD-1 (*ví dụ*, kháng thể kháng PD-1 như được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2015/0203579, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó), để dùng đồng thời, riêng biệt và/hoặc theo trình tự trong việc điều trị bệnh ung thư hoặc nhiễm virus. Ví dụ, mỗi kháng thể kháng LAG3 và chất ức chế PD-1 (*ví dụ*, kháng thể kháng PD-1) có thể được dùng cho đối tượng và/hoặc có trong đồng được phẩm với lượng được chọn từ nhóm gồm có 0,01mg, 0,02mg, 0,03mg, 0,04mg, 0,05mg, 0,1mg, 0,2mg, 0,3mg, 0,4mg, 0,5mg, 0,6mg, 0,7mg, 0,8mg, 0,9mg, 1,0mg, 1,5mg, 2,0mg, 2,5mg, 3,0mg, 3,5mg, 4,0mg, 4,5mg, 5,0mg, 6,0mg, 7,0mg, 8,0mg, 9,0mg, và 10,0mg. Tổ hợp/đồng được phẩm có thể được dùng cho đối tượng theo chế độ bất kỳ trong số các chế độ dùng được bộc lộ trong bản mô tả này, bao gồm, *ví dụ*, hai lần một tuần, một lần mỗi tuần, một lần mỗi 2 tuần, một lần mỗi 3 tuần, một lần mỗi tháng, một lần mỗi 2 tháng, một lần mỗi 3 tháng, một lần mỗi 4 tháng, một lần mỗi 5 tháng, một lần mỗi 6 tháng, v.v.. Kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế, ví dụ, có thể được dùng với liều nằm trong khoảng từ 0,8 đến khoảng 11, khoảng từ 1 đến khoảng 10, khoảng từ 3 đến khoảng 10, khoảng 1, khoảng 3 hoặc khoảng

10mg/kg, đồng thời với chất ức chế PD-1 (ví dụ kháng thể kháng PD-1 như được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2015/0203579) ở liều nằm trong khoảng từ 3 đến 5 hoặc khoảng 3,0mg/kg. Ví dụ, việc dùng đồng thời có thể thực hiện mỗi 14 ngày, 21 ngày hoặc 28 ngày.

Theo phương án làm ví dụ, trong đó kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế được dùng kết hợp với chất đối kháng VEGF (ví dụ, VEGF trap như aflibercept), bao gồm việc dùng đồng được phẩm chứa kháng thể kháng LAG3 và chất đối kháng VEGF, các thành phần đơn lẻ có thể được dùng cho đối tượng và/hoặc đồng bào chế bằng cách sử dụng nhiều tổ hợp liều. Ví dụ, kháng thể kháng LAG3 có thể được dùng cho đối tượng và/hoặc có trong đồng được phẩm với lượng được chọn từ nhóm gồm có 0,01mg, 0,02mg, 0,03mg, 0,04mg, 0,05mg, 0,1mg, 0,2mg, 0,3mg, 0,4mg, 0,5mg, 0,6mg, 0,7mg, 0,8mg, 0,9mg, 1,0mg, 1,5mg, 2,0mg, 2,5mg, 3,0mg, 3,5mg, 4,0mg, 4,5mg, 5,0mg, 6,0mg, 7,0mg, 8,0mg, 9,0mg, và 10,0mg; và chất đối kháng VEGF (ví dụ, VEGF trap như aflibercept) có thể được dùng cho đối tượng và/hoặc có trong đồng được phẩm với lượng được chọn từ nhóm gồm có 0,1mg, 0,2mg, 0,3mg, 0,4mg, 0,5mg, 0,6mg, 0,7mg, 0,8mg, 0,9mg, 1,0mg, 1,1mg, 1,2mg, 1,3mg, 1,4mg, 1,5mg, 1,6mg, 1,7mg, 1,8mg, 1,9mg, 2,0mg, 2,1mg, 2,2mg, 2,3mg, 2,4mg, 2,5mg, 2,6mg, 2,7mg, 2,8mg, 2,9mg và 3,0mg. Các tổ hợp/đồng được phẩm có thể được dùng cho đối tượng theo chế độ bất kỳ trong số các chế độ dùng được bộc lộ trong bản mô tả này, bao gồm, ví dụ, hai lần một tuần, một lần một tuần, một lần mỗi 2 tuần, một lần mỗi 3 tuần, một lần mỗi tháng, một lần mỗi 2 tháng, một lần mỗi 3 tháng, một lần mỗi 4 tháng, một lần mỗi 5 tháng, một lần mỗi 6 tháng, v.v..

Chế độ dùng

Theo các phương án nhất định của sáng chế, nhiều liều chứa kháng thể kháng LAG3 (hoặc được phẩm chứa tổ hợp của kháng thể kháng LAG3 và chất bất kỳ trong số các thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung được bộc lộ trong bản mô tả này) có thể được dùng cho đối tượng trong khoảng thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho đối tượng dùng theo trình tự nhiều liều chứa kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "dùng theo trình tự" có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng LAG3 được dùng cho đối tượng ở thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau phân cách khoảng thời gian định trước (ví dụ, các giờ, các ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế đề cập đến phương pháp

mà bao gồm bước cho người bệnh dùng theo trình tự một liều ban đầu chứa kháng thể kháng LAG3, tiếp theo một hoặc nhiều liều thứ hai chứa kháng thể kháng LAG3, và tùy ý tiếp theo một hoặc nhiều liều thứ ba chứa kháng thể kháng LAG3. Kháng thể kháng LAG3 có thể được dùng với liều nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 100mg/kg thể trọng của đối tượng.

Các thuật ngữ "liều ban đầu", "liều thứ hai", và "liều thứ ba", dùng để chỉ trình tự dùng tạm thời kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế. Do đó, "liều ban đầu" là liều mà được dùng khi bắt đầu chế độ điều trị (cũng được dùng để chỉ "liều cơ sở"); "liều thứ hai" là liều mà được dùng sau liều ban đầu; và "liều thứ ba" là liều mà được dùng sau liều thứ hai. Liều ban đầu, liều thứ hai, và liều thứ ba tất cả có thể chứa cùng một lượng kháng thể kháng LAG3, nhưng thường có thể khác nhau về tần suất dùng. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, lượng kháng thể kháng LAG3 có trong các liều ban đầu, liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba thay đổi với nhau (ví dụ, được điều chỉnh tăng hoặc giảm, nếu phù hợp) trong tiến trình điều trị. Theo các phương án nhất định, hai hoặc nhiều liều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) được dùng khi bắt đầu chế độ điều trị dưới dạng "liều nạp" tiếp theo các liều tiếp theo mà được dùng trên cơ sở tần suất ít hơn (ví dụ, "các liều duy trì").

Theo các phương án nhất định, lượng kháng thể kháng LAG3 có trong liều ban đầu, liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba có thể là gần mức tối ưu hoặc gần mức trị liệu. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "gần mức trị liệu" hoặc "gần mức tối ưu" dùng để chỉ liều kháng thể được dùng với liều quá thấp, mức để tạo ra tác dụng trị liệu hoặc nhỏ hơn nồng độ cần để điều trị bệnh như bệnh ung thư.

Theo các phương án làm ví dụ của sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc thứ ba được dùng từ 1 đến 26 tuần (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc lớn hơn) sau liều ngay trước. Cụm từ "sau liều ngay trước", như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là theo trình tự nhiều lần dùng, liều kháng thể kháng LAG3 mà được dùng cho người bệnh trước khi dùng liều tiếp theo theo trình tự mà không có liều xen giữa.

Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm bước cho người

bệnh dùng số lượng liều bất kỳ trong số liều thứ hai và/hoặc thứ ba chứa kháng thể kháng LAG3. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chỉ có một liều thứ hai được dùng cho người bệnh. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều liều thứ hai (*ví dụ*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) được dùng cho người bệnh. Tương tự, theo các phương án nhất định, chỉ có một liều thứ ba được dùng cho người bệnh. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều liều thứ ba (*ví dụ*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) được dùng cho người bệnh.

Theo các phương án bao gồm nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được dùng ở cùng một tần suất như các liều thứ hai khác. Ví dụ, mỗi liều thứ hai có thể được dùng cho người bệnh 1 đến 2 tuần hoặc 1 đến 2 tháng sau liều ngay trước. Tương tự, theo các phương án bao gồm nhiều liều thứ ba, mỗi liều thứ ba có thể được dùng ở cùng một tần suất như các liều thứ ba khác. Ví dụ, mỗi liều thứ ba có thể được dùng cho người bệnh 2 đến 12 tuần sau liều ngay trước. Theo các phương án nhất định của sáng chế, tần suất mà ở đó các liều thứ hai và/hoặc thứ ba được dùng cho người bệnh có thể thay đổi theo thời gian của chế độ điều trị. Tần suất dùng cũng có thể được điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi thầy thuốc phụ thuộc vào nhu cầu của người bệnh đơn lẻ sau khi thử nghiệm lâm sàng.

Sử dụng kháng thể trong chẩn đoán

Kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo LAG3 trong mẫu, *ví dụ*, nhằm mục đích chẩn đoán. Một số phương án đề cập đến sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế trong các thử nghiệm để phát hiện bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư, bệnh tự miễn dịch hoặc nhiễm virus. Các thử nghiệm chẩn đoán làm *ví dụ* đối với LAG3 có thể bao gồm, *ví dụ*, cho mẫu, thu được từ đối tượng (*ví dụ*, người bệnh), tiếp xúc với kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng LAG3 được đánh dấu bằng phân tử đánh dấu phát hiện được hoặc phân tử thông báo hoặc được sử dụng làm phối tử bắt giữ để phân lập có chọn lọc LAG3 từ các mẫu của đối tượng. Theo cách khác, kháng thể kháng LAG3 không được đánh dấu có thể được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai mà tự được đánh dấu theo cách phát hiện. Phân tử đánh dấu phát hiện được hoặc phân tử thông báo có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc huỳnh quang hoặc hoá huỳnh quang như florescein isothiocyanat hoặc rhodamin; hoặc enzym như phosphatase kiềm, β -galactosidase, horseradish

peroxidaza, hoặc luxiferaza. Các thử nghiệm làm ví dụ cụ thể mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc đo LAG3 trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA), và phân loại tế bào hoạt hoá huỳnh quang (FACS).

Các mẫu có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán LAG3 theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc mẫu chất lỏng bất kỳ thu được từ đối tượng, mà chứa lượng phát hiện được của protein LAG3, hoặc mảnh của nó, trong các điều kiện thông thường hoặc tình trạng bệnh lý. Thông thường, các mức của LAG3 trong mẫu cụ thể thu được từ người khỏe mạnh (ví dụ, người bệnh không bị đau bởi bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn dịch) sẽ được đo để thiết lập ban đầu mức LAG3 cơ sở hoặc tiêu chuẩn. Tiếp theo, mức cơ sở này của LAG3 có thể được so với mức LAG3 được đo trong các mẫu thu được từ các cá nhân bị nghi có tình trạng bệnh có liên quan đến bệnh ung thư, hoặc triệu chứng có liên quan đến tình trạng bệnh này.

Các kháng thể đặc hiệu đối với LAG3 có thể không chứa các chất đánh dấu hoặc các gốc bổ sung, hoặc chúng có thể chứa chất đánh dấu hoặc gốc đầu N hoặc đầu C. Theo một phương án, chất đánh dấu hoặc gốc này là biotin. Trong thử nghiệm gắn kết, vị trí của chất đánh dấu (nếu có) có thể xác định hướng của peptit so với bề mặt khi peptit được gắn kết. Ví dụ, nếu bề mặt được phủ bằng avidin, peptit chứa biotin đầu N sẽ được định hướng sao cho phần đầu C của peptit sẽ cách xa bề mặt này.

Các khía cạnh theo sáng chế đề cập đến việc sử dụng các kháng thể theo sáng chế làm chất đánh dấu để dự đoán tiên lượng bệnh ung thư hoặc nhiễm virus ở người bệnh. Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán để đánh giá tiên lượng bệnh ung thư ở người bệnh và dự đoán sự sống.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải biết cách tạo ra và sử dụng phương pháp và dược phẩm theo sáng chế, và không nhằm làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Các nỗ lực đã được thực hiện để đảm bảo độ chính xác tương đối với chữ số được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.) nhưng một số lỗi và sai số thử nghiệm nên được xét đến. Trừ khi có quy định khác, các phần là các phần theo trọng lượng, trọng lượng phân tử là trọng lượng phân tử trung bình, nhiệt độ tính theo °C, nhiệt độ trong phòng là khoảng 25°C, và áp suất tính theo áp suất khí quyển hoặc gần

như áp suất khí quyển.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể người kháng LAG3

Các kháng thể người kháng LAG3 được tạo ra bằng cách sử dụng mảnh LAG3 mà nằm trong khoảng từ axit amin 29 đến 450 có số truy cập GenBank NP_002277.4 (SEQ ID NO:582) được ghép với vùng Fc của chuột nhắt. Chất sinh miễn dịch được dùng trực tiếp, với chất bổ trợ để kích thích đáp ứng miễn dịch, cho chuột nhắt VELOCIMMUNE® (nghĩa là, chuột nhắt được thao tác di truyền chứa ADN mã hoá các vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch và chuỗi nhẹ kappa của người), như được mô tả trong patent Mỹ số US 8502018 B2, hoặc cho chuột nhắt VelocImmune® có chuỗi nhẹ toàn cầu (ULC) được làm giống người, như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2013022782. Đáp ứng miễn dịch kháng thể được kiểm tra bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu LAG3. Khi đạt được đáp ứng miễn dịch mong muốn, thu gom tế bào lá lách và được dung hợp với tế bào u tuỷ của chuột nhắt để bảo tồn khả năng sống của chúng và tạo ra dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai này được sàng lọc và lựa chọn để nhận biết các dòng tế bào mà tạo ra các kháng thể đặc hiệu LAG3. Bằng cách sử dụng kỹ thuật này và chất gây miễn dịch được mô tả ở trên, thu được vài kháng thể kháng LAG3 (nghĩa là, các kháng thể có miền biến đổi của người và miền hằng định của chuột nhắt); các kháng thể làm ví dụ được tạo ra theo cách này từ chuột nhắt VELOCIMMUNE® được ký hiệu là H1M14985N, H1M14987N, H2M14811N, H2M14885N, H2M14926N, H2M14927N, H2M14931N, H2M18336N, H2M18337N và H4H14813N.

Kháng thể kháng LAG3 cũng được phân lập trực tiếp từ tế bào B dương tính với kháng nguyên (từ một trong hai chuột nhắt được gây miễn dịch) mà không dung hợp với tế bào u tuỷ, như được mô tả trong patent Mỹ số 7,582,298, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó. Bằng cách sử dụng phương pháp này, thu được vài kháng thể kháng LAG3 đầy đủ của người (nghĩa là, các kháng thể có các miền biến đổi của người và miền hằng định của người); các kháng thể làm ví dụ được tạo ra theo cách này được ký hiệu như sau: H4H15477P, H4H15483P, H4H15484P, H4H15491P, H4H17823P, H4H17826P2, H4H17828P2, H4sH15460P, H4sH15462P, H4sH15463P, H4sH15464P, H4sH15466P, H4sH15467P, H4sH15470P, H4sH15475P, H4sH15479P, H4sH15480P, H4sH15482P, H4sH15488P, H4sH15496P2, H4sH15498P2, H4sH15505P2, H4sH15518P2,

H4sH15523P2, H4sH15530P2, H4sH15555P2, H4sH15558P2, H4sH15567P2, và H4H17819P.

Các kháng thể làm ví dụ H4sH15496P2, H4sH15498P2, H4sH15505P2, H4sH15518P2, H4sH15523P2, H4sH15530P2, H4sH15555P2, H4sH15558P2, và H4sH15567P2 được tạo ra từ tế bào B của chuột nhắt ULC Velocimmune®.

Các đặc tính sinh học của các kháng thể làm ví dụ được tạo ra theo các phương pháp của Ví dụ này được mô tả một cách chi tiết trong các Ví dụ nêu dưới đây.

Ví dụ 2: Trình tự axit amin và nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 1 đưa ra ký hiệu nhận biết trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và CDR của kháng thể kháng LAG3 được lựa chọn của sáng chế. Các ký hiệu nhận biết trình tự axit nucleic tương ứng được đưa ra trong Bảng 2.

Bảng 1: Ký hiệu nhận biết trình tự axit amin

Ký hiệu kháng thể	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M14985N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M14987N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M14811N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M14885N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M14926N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M14927N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M14931N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M18336N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M18337N	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H15477P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H15483P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H15484P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H15491P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H17823P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H17826P2	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H17828P2	242	244	246	248	250	252	254	256

H4sH15460P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4sH15462P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4sH15463P	290	292	294	296	298	300	302	304
H4sH15464P	306	308	310	312	314	316	318	320
H4sH15466P	322	324	326	328	330	332	334	336
H4sH15467P	338	340	342	344	346	348	350	352
H4sH15470P	354	356	358	360	362	364	366	368
H4sH15475P	370	372	374	376	378	380	382	384
H4sH15479P	386	388	390	392	394	396	398	400
H4sH15480P	402	404	406	408	410	412	414	416
H4sH15482P	418	420	422	424	426	428	430	432
H4sH15488P	434	436	438	440	442	444	446	448
H4sH15496P2	450	452	454	456	522	524	526	528
H4sH15498P2	458	460	462	464	522	524	526	528
H4sH15505P2	466	468	470	472	522	524	526	528
H4sH15518P2	474	476	478	480	522	524	526	528
H4sH15523P2	482	484	486	488	522	524	526	528
H4sH15530P2	490	492	494	496	522	524	526	528
H4sH15555P2	498	500	502	504	530	532	534	536
H4sH15558P2	506	508	510	512	530	532	534	536
H4sH15567P2	514	516	518	520	530	532	534	536
H4H14813N	538	540	542	544	546	548	550	552
H4H17819P	554	556	558	560	562	564	566	568

Bảng 2: Ký hiệu nhận biết trình tự axit nucleic

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M14985N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1M14987N	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M14811N	33	35	37	39	41	43	45	47

H2M14885N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M14926N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M14927N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M14931N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M18336N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M18337N	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H15477P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H15483P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H15484P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H15491P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H17823P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H17826P2	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H17828P2	241	243	245	247	249	251	253	255
H4sH15460P	257	259	261	263	265	267	269	271
H4sH15462P	273	275	277	279	281	283	285	287
H4sH15463P	289	291	293	295	297	299	301	303
H4sH15464P	305	307	309	311	313	315	317	319
H4sH15466P	321	323	325	327	329	331	333	335
H4sH15467P	337	339	341	343	345	347	349	351
H4sH15470P	353	355	357	359	361	363	365	367
H4sH15475P	369	371	373	375	377	379	381	383
H4sH15479P	385	387	389	391	393	395	397	399
H4sH15480P	401	403	405	407	409	411	413	415
H4sH15482P	417	419	421	423	425	427	429	431
H4sH15488P	433	435	437	439	441	443	445	447
H4sH15496P2	449	451	453	455	521	523	525	527
H4sH15498P2	457	459	461	463	521	523	525	527
H4sH15505P2	465	467	469	471	521	523	525	527
H4sH15518P2	473	475	477	479	521	523	525	527
H4sH15523P2	481	483	485	487	521	523	525	527
H4sH15530P2	489	491	493	495	521	523	525	527

H4sH15555P2	497	499	501	503	529	531	533	535
H4sH15558P2	505	507	509	511	529	531	533	535
H4sH15567P2	513	515	517	519	529	531	533	535
H4H14813N	537	539	541	543	545	547	549	551
H4H17819P	553	555	557	559	561	563	565	567

Thông thường, các kháng thể được đề cập trong bản mô tả này theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ "H1M", "H4sH", "H4H" v.v.), tiếp theo ký hiệu nhận biết bằng số (ví dụ "14813", "17828", v.v, như được thể hiện trong Bảng 1), tiếp theo bởi hậu tố "P", "P2", hoặc "N". Do đó, theo danh pháp này, kháng thể có thể được ký hiệu trong bản mô tả này dưới dạng, ví dụ, "H4sH14813N", "H4H17819P", "H4H17828P2", v.v.. Các tiền tố H4sH và H4H trên ký hiệu kháng thể được sử dụng trong bản mô tả này biểu thị lớp kháng thể vùng Fc cụ thể của kháng thể. Ví dụ, kháng thể "H4sH" có Fc IgG4 của người với 2 hoặc nhiều thay đổi axit amin như được bộc lộ trong patent Mỹ số US20140243504 (được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó), kháng thể "H4H" có Fc IgG4 của người với đột biến serin thành prolin trong vùng bản lề (S108P), kháng thể "H1M" có Fc IgG1 của chuột nhắt, và kháng thể "H2M" có Fc IgG2 của chuột nhắt (tất cả các vùng biến đổi là của người đầy đủ như được ký hiệu bởi 'H' thứ nhất trong ký hiệu kháng thể). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải biết rằng, kháng thể có lớp kháng thể Fc cụ thể có thể được biến đổi thành kháng thể với lớp kháng thể Fc khác nhau (ví dụ, kháng thể với Fc IgG1 của chuột nhắt có thể được biến đổi thành kháng thể với IgG4 của người, v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, các miền biến đổi (bao gồm các CDR) – mà được biểu thị bởi ký hiệu nhận biết theo số được thể hiện trong Bảng 1 – vẫn sẽ giống nhau và các đặc tính gắn kết với kháng nguyên được dự đoán là giống nhau hoặc gần như tương đồng bất chấp bản chất của miền Fc.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể được lựa chọn với Fc IgG1 của chuột nhắt được biến đổi thành các kháng thể với Fc IgG4 của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể chứa Fc IgG4 của người với 2 hoặc nhiều thay đổi axit amin như được bộc lộ trong tài liệu US20100331527 (được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó). Theo một phương án, miền Fc IgG4 có đột biến serin thành prolin trong vùng bản lề (S108P) để thúc đẩy quá trình ổn định

hoá dime. Theo các phương án nhất định, vùng Fc của các kháng thể theo sáng chế có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 569, 570, 571, 572 hoặc 573. Bảng 3 đưa ra ký hiệu nhận biết trình tự axit amin của trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng LAG3 được lựa chọn với Fc IgG4 của người.

Bảng 3: Ký hiệu nhận biết trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Ký hiệu kháng thể	SEQ ID NO:	
	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ
H4sH15482P	577	578
H4H15482P	579	578
H4sH14813N	580	581

Mỗi trình tự chuỗi nặng trong Bảng 3 bao gồm vùng biến đổi (V_H hoặc HCVR; bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và vùng hằng định (bao gồm miền C_H1 , C_H2 và C_H3). Mỗi trình tự chuỗi nhẹ trong Bảng 3 bao gồm vùng biến đổi (V_L hoặc LCVR; bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3) và vùng hằng định (C_L). SEQ ID NO: 577 chứa HCVR có axit amin 1 đến 123 và vùng hằng định có axit amin 124 đến 449. SEQ ID NO: 578 bao gồm LCVR có axit amin 1 đến 107 và vùng hằng định có axit amin 108 đến 214. SEQ ID NO: 579 bao gồm HCVR có axit amin 1 đến 123 và vùng hằng định có axit amin 124 đến 450. SEQ ID NO: 580 bao gồm HCVR có axit amin 1 đến 119 và vùng hằng định có axit amin 120 đến 445. SEQ ID NO: 581 bao gồm LCVR có axit amin 1 đến 107 và vùng hằng định có axit amin 108 đến 214.

Cấu trúc đối chứng được sử dụng trong các ví dụ sau

Hai cấu trúc đối chứng (kháng thể kháng LAG3) có trong các thử nghiệm sau nhằm mục đích so sánh: "Cấu trúc so sánh 1", kháng thể đơn dòng kháng LAG3 của người có các trình tự V_H/V_L của kháng thể "25F7" theo công bố đơn quốc tế số WO2010/019570; và "Cấu trúc so sánh 2", kháng thể đơn dòng kháng LAG3 của người có các trình tự V_H/V_L của kháng thể "v3.5" theo patent Mỹ số US2014/0093511.

Ví dụ 3: Kháng thể gắn kết với LAG3 như xác định được bởi cộng hưởng plasmon bề mặt

Hằng số tốc độ kết hợp và phân ly gắn kết (lần lượt là k_a và k_d), các hằng số phân ly cân bằng và chu kỳ bán rã phân ly (lần lượt là K_D và $t_{1/2}$) đối với kháng nguyên

gắn kết với kháng thể kháng LAG3 được tinh chế được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt theo thời gian thực trên thiết bị BiaCore 4000 hoặc BiaCore T200. Bề mặt cảm biến BiaCore được tạo dẫn xuất với kháng thể đa dòng kháng chuột của thỏ (GE, # BR-1008-38) hoặc với kháng thể đơn dòng kháng Fc người của chuột nhắt (GE, # BR-1008-39) để giữ khoảng 50 đến 85 RU kháng thể đơn dòng kháng LAG3, lần lượt được biểu hiện với Fc của chuột nhắt hoặc Fc của người. Các thuốc thử LAG3 được thử nghiệm để gắn kết với kháng thể kháng LAG3 bao gồm LAG3 tái tổ hợp của người được biểu hiện với thể myc-myc-hexahistidin đầu C (hLAG3-mmh; SEQ ID: 574) và LAG3 tái tổ hợp của người được biểu hiện với thể IgG2a mFc của chuột nhắt đầu C (hLAG3-mFc; SEQ ID: 575). Các nồng độ khác nhau (50, 25, 12,5 và 6,25nM) của các thuốc thử LAG3 được tiêm qua bề mặt bất kháng thể đơn dòng kháng LAG3 ở tốc độ dòng 50µL/phút trên BiaCore T200. Sự gắn kết của các thuốc thử LAG3 với kháng thể đơn dòng được bắt giữ được kiểm tra trong 4 phút trong khi sự phân ly của chúng ra khỏi kháng thể được kiểm tra trong 8 phút trong dung dịch đệm chạy HBST (HEPES HEPES 0,01M độ pH=7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, Surfactant P20 0,05% thể tích/thể tích). Các thử nghiệm được thực hiện ở 25°C và 37°C. Các hằng số tốc độ kết hợp (k_a) và phân ly (k_d) động học được xác định bằng cách xử lý và so khớp dữ liệu với mô hình gắn kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm so khớp đường cong Scrubber 2.0c. Tiếp theo, hằng số cân bằng phân ly gắn kết (K_D) và chu kỳ bán rã phân ly ($t_{1/2}$) được tính toán dựa vào hằng số tốc độ động học như: K_D (M) = k_d/k_a và $t_{1/2}$ (phút) = $[\ln 2/(60*k_d)]$.

Các tham số động học gắn kết đối với các kháng thể đơn dòng kháng LAG3 khác nhau gắn kết với các thuốc thử LAG3 monome (tạo thể với mmH) hoặc dime (tạo thể với mFc) ở 25°C và 37°C được nêu trong các bảng từ Bảng 4 đến Bảng 7.

Bảng 4: Các tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng LAG3 gắn kết với LAG3-mmh của người ở 25°C

	25°C			
	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
Ab ID	(l/mol*s)	(1/s)	[M]	(phút)
H4H15479P	1,09E+06	5,35E-05	4,93E-11	215,9
H4sH15479P	1,23E+06	5,98E-05	4,87E-11	193,1

H4sH14813N	4,45E+05	7,89E-05	1,77E-10	146,4
H4H14813N	4,11E+05	8,80E-05	2,14E-10	131,2
H4H15498P2	3,01E+05	7,81E-05	2,60E-10	147,9
H4H17819P	1,13E+06	4,43E-04	3,91E-10	26
H4H17823P	1,04E+06	4,47E-04	4,29E-10	25,8
H4sH15498P2	1,57E+05	1,01E-04	6,45E-10	114
H4H15482P	1,99E+05	1,94E-04	9,72E-10	59,7
H4sH15482P	2,12E+05	2,60E-04	1,23E-09	44,5
H4H15483P	1,88E+05	3,70E-04	1,97E-09	31,2
H4H17828P2	6,12E+05	1,41E-03	2,31E-09	8,2
H4H15462P	9,39E+05	5,40E-03	5,75E-09	2,1
H4sH15462P	1,07E+06	6,97E-03	6,51E-09	1,7
H4H17826P2	4,50E+05	4,57E-03	1,02E-08	2,5
Lớp kháng thể đối chứng 1	NB	NB	NB	NB
Lớp kháng thể đối chứng 2	NB	NB	NB	NB
Kháng thể so sánh 1	1,09E+06	8,70E-04	8,02E-10	13,3
Kháng thể so sánh 2	1,01E+06	5,82E-04	5,77E-10	19,9

*NB biểu thị rằng trong các điều kiện thử nghiệm, thuốc thử LAG3 không gắn kết với kháng thể đơn dòng kháng LAG3 được bắt giữ

Bảng 4 thể hiện rằng ở 25°C, tất cả kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế được gắn kết với hLAG3-mmh với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 49pM đến 10nM, trong khi các kháng thể so sánh được gắn kết với các trị số K_D là 0,58nM và 0,8nM.

Bảng 5: Tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng LAG3 gắn kết với hLAG3-mmh ở 37°C

	37°C			
	k_a	k_d	K_D^*	$t_{1/2}$
Ab ID	(l/mol*s)	(1/s)	[M]	(phút)
H4H15479P	1,27E+06	4,08E-05	3,21E-11	283
H4sH15479P	1,24E+06	4,24E-05	3,41E-11	272,5
H4H15498P2	3,81E+05	2,96E-05	7,83E-11	390,2

H4sH15498P2	3,78E+05	7,08E-05	1,85E-10	163,1
H4sH14813N	5,78E+05	1,54E-04	2,66E-10	75,1
H4H14813N	5,35E+05	1,52E-04	2,84E-10	76
H4H17823P	1,76E+06	9,24E-04	5,24E-10	12,5
H4H17819P	1,59E+06	8,76E-04	5,52E-10	13,2
H4H15483P	7,74E+05	1,11E-03	1,43E-09	10,4
H4sH15482P	2,81E+05	5,12E-04	1,82E-09	22,6
H4H17828P2	1,10E+06	2,07E-03	1,89E-09	5,6
H4H15482P	2,92E+05	5,70E-04	1,96E-09	20,2
H4H17826P2	1,07E+06	2,14E-03	1,99E-09	5,4
H4H15462P	1,08E+06	6,26E-03	5,80E-09	1,8
H4sH15462P	1,01E+06	7,72E-03	7,66E-09	1,5
Lớp kháng thể đối chứng 1	NB	NB	NB	NB
Lớp kháng thể đối chứng 2	NB	NB	NB	NB
Kháng thể so sánh 1	1,23E+06	3,74E-03	3,03E-09	3,1
Kháng thể so sánh 2	1,10E+06	2,31E-03	2,10E-09	5

*NB biểu thị rằng trong các điều kiện thử nghiệm, thuốc thử LAG3 không gắn kết với kháng thể đơn dòng kháng LAG3 được bắt giữ.

Bảng 5 thể hiện rằng ở 37°C, tất cả kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế được gắn kết với hLAG3-mmh với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 32pM đến 7,66nM, trong khi các kháng thể so sánh được gắn kết với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 2,1nM đến 3,0nM.

Các dữ liệu trong Bảng 4 và 5 biểu thị rằng tất cả kháng thể kháng LAG3 gắn kết với hLAG3-mmh monome với các ái lực rất tương tự ở cả 25°C và 37°C.

Bảng 6: Tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng LAG3 gắn kết với hLAG3 dime (hLAG3-mFc) ở 25°C

	25°C			
	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
Ab ID	(l/mol*s)	(1/s)	[M]	(phút)
H4H15479P	2,30E+06	1,00E-05	4,35E-12	≥1155,0

H4sH15479P	3,05E+06	1,00E-05	3,28E-12	$\geq 1155,0$
H4H15483P	1,34E+06	1,00E-05	7,45E-12	$\geq 1155,0$
H4H14813N	9,58E+05	1,00E-05	1,04E-11	$\geq 1155,0$
H4sH14813N	1,80E+06	1,90E-05	1,06E-11	606,6
H4H15482P	7,58E+05	1,00E-05	1,32E-11	$\geq 1155,0$
H4sH15482P	7,09E+05	1,00E-05	1,41E-11	$\geq 1155,0$
H4H15498P2	3,63E+05	1,00E-05	2,76E-11	$\geq 1155,0$
H4sH15498P2	2,84E+05	1,00E-05	3,52E-11	$\geq 1155,0$
H4H17819P	1,45E+06	1,80E-04	1,24E-10	64,2
H4H17823P	1,26E+06	2,18E-04	1,74E-10	52,9
H4H17828P2	1,88E+06	4,60E-04	2,45E-10	25,1
H4sH15462P	2,34E+06	1,90E-03	8,14E-10	6,1
H4H17826P2	6,91E+05	5,64E-04	8,17E-10	20,5
H4H15462P	2,02E+06	2,03E-03	1,01E-09	5,7
Lớp kháng thể đối chứng 1	NB*	NB	NB	NB
Lớp kháng thể đối chứng 2	NB	NB	NB	NB
Kháng thể so sánh 1	2,69E+06	4,50E-04	1,67E-10	25,7
Kháng thể so sánh 2	3,09E+06	3,00E-04	9,68E-11	38,6

*NB biểu thị rằng trong các điều kiện thử nghiệm, thuốc thử LAG3 không gắn kết với kháng thể đơn dòng kháng LAG3 được bắt giữ.

Bảng 6 thể hiện rằng ở 25°C, tất cả kháng thể kháng LAG3 của sáng chế được gắn kết với protein dimer hLAG3 với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 4,3pM đến 1,0nM, trong khi các kháng thể so sánh được gắn kết với các trị số K_D là 97pM và 0,16nM.

Bảng 7: Tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng LAG3 gắn kết với dimer hLAG3 (hLAG3-mFc) ở 37°C

	37°C			
	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
Ab ID	(l/mol*s)	(1/s)	[M]	(phút)
H4H15479P	2,50E+06	1,00E-05	3,99E-12	$\geq 1155,0$

H4sH15479P	2,92E+06	1,00E-05	3,42E-12	$\geq 1155,0$
H4sH15498P2	5,15E+05	1,00E-05	1,94E-11	$\geq 1155,0$
H4H15498P2	4,60E+05	1,00E-05	2,17E-11	$\geq 1155,0$
H4H14813N	4,27E+06	1,17E-04	2,74E-11	98,8
H4sH14813N	3,42E+06	1,01E-04	2,95E-11	114,4
H4sH15482P	5,19E+06	1,64E-04	3,16E-11	70,3
H4H15482P	1,01E+06	9,01E-05	8,91E-11	128,1
H4H15483P	1,38E+06	2,98E-04	2,15E-10	38,8
H4H17826P2	1,98E+06	5,47E-04	2,77E-10	21,1
H4H17819P	1,66E+06	5,27E-04	3,17E-10	21,9
H4H17828P2	1,73E+06	7,18E-04	4,15E-10	16,1
H4H15462P	2,16E+06	8,95E-04	4,15E-10	12,9
H4H17823P	1,34E+06	5,85E-04	4,37E-10	19,7
H4sH15462P	1,80E+06	1,57E-03	8,76E-10	7,3
Lớp kháng thể đối chứng 1	NB	NB	NB	NB
Lớp kháng thể đối chứng 2	NB	NB	NB	NB
Kháng thể so sánh 1	3,44E+06	1,56E-03	4,54E-10	7,4
Kháng thể so sánh 2	4,36E+06	1,13E-03	2,58E-10	10,3

*NB biểu thị rằng trong các điều kiện thử nghiệm, thuốc thử LAG3 không gắn kết với kháng thể đơn dòng kháng LAG3 được bắt giữ.

Bảng 7 thể hiện rằng ở 37°C, tất cả kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế được gắn kết với protein dimer hLAG3 với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 4,0pM đến 0,9nM, trong khi các kháng thể so sánh được gắn kết với các trị số K_D là 0,26nM và 0,45nM.

Dữ liệu trong các Bảng 6 và 7 biểu thị rằng tất cả kháng thể kháng LAG3 gắn kết với các thuốc thử dimer hLAG3 với các ái lực tương tự ở cả 25°C và 37°C.

Ví dụ 4: Sự cạnh tranh chéo Octet giữa kháng thể kháng LAG3

Để đánh giá xem liệu hai kháng thể có cạnh tranh với nhau để gắn kết với LAG3 của người dạng monome hay không, sự cạnh tranh gắn kết (hLAG3.mmh) giữa kháng thể đơn dòng kháng LAG3 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không đánh dấu theo thời gian thực trên bộ cảm biến sinh học Octet

RED384 (Pall ForteBio Corp.). Thử nghiệm cạnh tranh chéo được thực hiện ở 25°C trong HEPES 0,01M độ pH=7,4, NaCl 0,15M, Surfactant Tween-20 0,05% thể tích/thể tích, 0,1mg/mL BSA (dung dịch đệm Octet HBS-P) với tấm lắc ở tốc độ 1.000 vòng/phút. Tất cả dung dịch kháng thể kháng LAG3 và hLAG3 được thử nghiệm được bảo chế trong dung dịch đệm Octet HBS-P. Để đánh giá xem liệu 2 kháng thể có khả năng cạnh tranh với nhau để gắn kết với hLAG3 hay không, khoảng từ 0,6 đến 0,85nm hLAG3.mmh trước tiên được bắt giữ trên đầu cảm biến sinh học Octet được phủ kháng thể kháng His từ các giếng chứa 5µg/mL hLAG3 trong 75 giây. Các đầu cảm biến sinh học Octet được bắt giữ hLAG3 được bão hoà bằng cách làm chìm trong 5 phút vào trong các giếng chứa 50ug/ml kháng thể đơn dòng kháng LAG3 thứ nhất (do đó được gọi là mAb-1), tiếp theo làm chìm trong các giếng chứa kháng thể đơn dòng kháng LAG3 thứ hai (do đó được gọi là mAb-2). Giữa mỗi bước, các đầu cảm biến sinh học Octet được rửa trong dung dịch đệm HBS-P trong 30 giây.

Đáp ứng gắn kết theo thời gian thực được theo dõi trong quá trình thử nghiệm và ghi lại đáp ứng gắn kết khi kết thúc mỗi bước. Đáp ứng của gắn kết hLAG3 với mAb-1 và tiếp theo với mAb phong bế được hiệu chỉnh để gắn kết cơ bản, so sánh và hành vi cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng Lag khác nhau được xác định.

Bảng 8 xác định rõ ràng các mối quan hệ của các kháng thể cạnh tranh theo cả hai hướng, độc lập theo thứ tự gắn kết.

Bảng 8: Sự cạnh tranh chéo của kháng thể kháng LAG3 để gắn kết với hLAG3 monome

mAb thứ nhất (mAb-1) được bắt giữ bằng cách sử dụng các bộ cảm biến sinh học AHC Octet	Các kháng thể mAb-2 được thể hiện để cạnh tranh với mAb-1*
H4sH15482P	H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P
H4sH15479P	H4sH15482P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P,

	H4H15482P, H4H15483P
H4sH14813N	H4sH15482P, H4sH15479P, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P
H4H14813N	H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H15479P, H4H15482P, H4H15483P
H4H15479P	H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15482P, H4H15483P
H4H15482P	H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15483P
H4H15483P	H4sH15482P, H4sH15479P, H4sH14813N, H4H14813N, H4H15479P, H4H15482P
H4sH15498P2	H4H15498P2, H4H17828P2, H4H17819P, H4H17823P
H4H15498P2	H4sH15498P2, H4H17828P2, H4H17819P, H4H17823P
H4H17828P2	H4sH15498P2, H4H15498P2, H4H17819P, H4H17823P
H4H17819P	H4sH15498P2, H4H15498P2, H4H17828P2, H4H17823P
H4H17823P	H4sH15498P2, H4H15498P2, H4H17828P2, H4H17819P
H4sH15462P	không
H4H15462P	không
H4H17826P2	không

(*mAb2 tự cạnh tranh không được liệt kê)

Ví dụ 5: Kháng thể gắn kết với tế bào biểu hiện quá mức LAG3 như được xác định bởi phép đếm dòng tế bào theo dòng chảy

Tế bào HEK293 (HEK293; ATCC, #CRL-1573) dòng tế bào ổn định mà biểu hiện hLAG3 tái tổ hợp (số truy cập NCBI NP_002277.4) hoặc LAG3 của khỉ (mLAG3) [số truy cập NCBI trình tự của khỉ cynomolgus XP_005570011.1 còn được biến đổi để thay thế “X” ở vị trí axit amin 74 với prolin dựa vào số truy cập NCBI trình tự của Rhesus macaque (*Macaca mulata*) XP_001108923.1] (SEQ ID NO: 576) ở bề mặt tế bào được phát triển và được sử dụng để xác định độ đặc hiệu gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng LAG3 theo sáng chế bằng phân tích đếm tế bào theo dòng chảy.

Đánh giá sự gắn kết của kháng thể kháng LAG3 như sau: tế bào HEK293 ổn

định biểu hiện hLAG3 hoặc mLAG3 được rửa 1 lần bằng D-PBS (Irvine Scientific Cat# 9240), được trypsin hoá (Specialty Media Cat# SM-2004-C) và được phong bế bằng môi trường nuôi cấy tế bào HEK293 (DME + FBS 10% + P/S/G + axit amin không thiết yếu). Sau khi tạo huyền phù tế bào ly tâm ở $2,0 \times 10^6$ tế bào/mL trong dung dịch đệm nhuộm (D-PBS + FBS 2%). Kháng thể kháng LAG3 và lớp kháng thể đối chứng được pha loãng theo loạt trong dung dịch đệm nhuộm với liều nằm trong khoảng từ 5pM đến 100nM không chứa dung dịch đệm kháng thể mà chỉ chứa đối chứng. Thêm các kháng thể được pha loãng theo loạt này vào huyền phù tế bào và ủ trong 15 đến 30 phút trên nước đá. Ly tâm tế bào và rửa viên bằng dung dịch đệm nhuộm để loại bỏ các kháng thể không được gắn kết. Tiếp theo, ủ tế bào trong 15 đến 30 phút trên nước đá với F(ab')₂ thứ hai được liên hợp allophycoxyanin nhận biết Fc của người (Jackson ImmunoResearch, # 109-136-170). Ly tâm tế bào và rửa viên bằng dung dịch đệm nhuộm để loại bỏ F(ab')₂ thứ cấp không được gắn kết và cố định qua đêm với dung dịch pha loãng 1:1 của Cytofix (BD Biosciences, # 554655) và dung dịch đệm nhuộm. Ngày tiếp theo, ly tâm tế bào được cố định và rửa viên bằng dung dịch đệm nhuộm, tạo huyền phù lại và lọc. Thu được các phép đo huỳnh quang trên tế bào kể HyperCyt® và phân tích trong ForeCyt™ (IntelliCyt; Albuquerque, NM) để xác định cường độ huỳnh quang trung bình (MFI). Các trị số EC₅₀ được tính toán dựa vào phương trình logitit bốn tham số qua đường cong đáp ứng 11 điểm bằng cách sử dụng GraphPad Prism. EC₅₀ được xác định là nồng độ của kháng thể mà ở đó 50% tín hiệu gắn kết tối đa được phát hiện. Tỷ lệ MFI đối với mỗi kháng thể được tính toán bằng cách chia MFI ở 100nM cho MFI ở 0nM nồng độ kháng thể.

Bảng 9: Sự gắn kết của kháng thể kháng LAG3 với tế bào kiểu đại HEK293 (wt) như được xác định bởi FACS

Ab PID#	FACS trên HEK293 wt	
	EC50 [M]	Tỷ lệ của MFI (100nM/0nM)
Lớp kháng thể đối chứng hIgG4	-	1,5
H4sH15462P	-	0,9
H4H15462P	-	8,2
H4sH15479P	-	1,1

H4H15479P	-	1,7
H4sH15482	-	1,2
H4H15482P	-	4,9
H4sH15498P2	-	1
H4H15498P2	-	1
H4sH14813N	-	1,5
H4H14813N	-	1,3
H4H17828P2	-	1,1
H4H17826P2	-	2,5
H4H17823P	-	2,5
H4H15483P	-	2,6
H4H17819P	-	1,1
Kháng thể so sánh 1	-	1
Kháng thể so sánh 2	-	1,6

Như được thể hiện trong Bảng 9, các kháng thể so sánh và lớp kháng thể đối chứng không chứng minh sự gắn kết do được bất kỳ với tế bào HEK293 kiểu đại ban đầu bởi phân tích FACS. Tỷ lệ MFI được tính toán nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,6x. Vài kháng thể kháng LAG3 thể hiện tỷ lệ cao hơn trên tế bào kiểu đại, biểu thị sự gắn kết không đặc hiệu, với tỷ lệ MFI được tính toán nằm trong khoảng từ 0,9 đến 8,2x. Trong các điều kiện nhuộm này, không có trị số EC_{50} nào được xác định đối với kháng thể kháng LAG3 cũng như kháng thể so sánh.

Bảng 10: Sự gắn kết của kháng thể kháng LAG3 với tế bào HEK293/hLag3 như được xác định bởi FACS

Ab PID#	FACS trên HEK293/hLAG3	
	EC_{50} [M]	Tỷ lệ của MFI (100nM/0nM)
Lớp kháng thể đối chứng hIgG4	-	1,8
H4sH15462P	6,65E-10	181,6
H4H15462P	3E-10	62,6
H4sH15479P	9,03E-10	198,7

H4H15479P	7,52E-10	203,2
H4sH15482	1,11E-09	140,8
H4H15482P	1,91E-09	103,7
H4sH15498P2	7,92E-09	400,6
H4H15498P2	5,76E-09	305
H4sH14813N	1,18E-09	197,2
H4H14813N	1,44E-09	208,5
H4H17828P2	2,65E-09	355,2
H4H17826P2	3,86E-09	414,2
H4H17823P	1,25E-09	304,9
H4H15483P	2,31E-09	206,3
H4H17819P	2,79E-09	435,8
Kháng thể so sánh 1	7,52E-10	188,2
Kháng thể so sánh 2	6,5E-10	150,9

Như được thể hiện trong Bảng 10, lớp kháng thể đối chứng không chứng minh sự gắn kết đo được bất kỳ với tế bào HEK293/hLag3. Tất cả 15 kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế thể hiện sự gắn kết đáng kể với tế bào HEK293/hLag3 với các trị số EC₅₀ nằm trong khoảng từ 300pM đến 7,9nM. Tỷ lệ MFI được tính toán nằm trong khoảng từ 62 đến 414x. Các trị số EC₅₀ đối với các kháng thể so sánh là 0,65nM và 0,75nM trong thử nghiệm gắn kết và tỷ lệ MFI nhỏ hơn 200x đối với cả hai kháng thể.

Bảng 11: Sự gắn kết của kháng thể kháng LAG3 với tế bào HEK293/mfLag3 như được xác định được bởi FACS

Ab PID#	FACS trên HEK293/mfLAG3	
	EC50 [M]	Tỷ lệ của MFI (100nM/0nM)
Lớp kháng thể đối chứng hIgG4	-	1,3
H4sH15462P	-	1
H4H15462P	-	2,9
H4sH15479P	9,02E-10	20,7
H4H15479P	1,35E-09	21,5

H4sH15482	1,15E-09	10
H4H15482P	2,2E-09	11,9
H4sH15498P2	>10nM	12,1
H4H15498P2	>10nM	12,8
H4sH14813N	1,57E-09	16,7
H4H14813N	1,42E-09	17,1
H4H17826P2	>10nM	14,3
H4H17823P	>10nM	12,4
H4H15483P	>10nM	8,8
H4H17819P	>10nM	12,1
Kháng thể so sánh 1	>10nM	6,7
Kháng thể so sánh 2	>10nM	8,6

Như được thể hiện trong Bảng 11, lớp kháng thể đối chứng không chứng minh sự gắn kết đo được bất kỳ với tế bào HEK293/mfLAG3. Tổng số 13 trong số 15 kháng thể kháng LAG3 theo sáng chế thể hiện sự gắn kết đáng kể với tế bào HEK293/mfLAG3 với trị số EC₅₀ nằm trong khoảng từ 900pM đến lớn hơn 10nM. Tỷ lệ MFI được tính toán nằm trong khoảng từ 8,8x đến 21,5x. Các trị số EC₅₀ đối với các kháng thể so sánh lớn hơn 10nM và tỷ lệ MFI được tính toán là 6,7x và 8,6x.

Ví dụ 6: Sự gắn kết của kháng thể với tế bào biểu hiện quá mức LAG3 như được xác định bởi thử nghiệm miễn dịch điện hoá phát quang

Để nghiên cứu khả năng của tám kháng thể đơn dòng kháng LAG3 gắn kết LAG3 được biểu hiện trên bề mặt tế bào, thử nghiệm gắn kết *in vitro* sử dụng các dòng tế bào biểu hiện LAG3 của người và khỉ trong nền tảng phát hiện trên cơ sở điện hóa phát quang [Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD – (MSD)] được phát triển.

Các dòng tế bào ổn định HEK293 (ATCC, #CRL-1573) được tạo ra bằng cách chuyển nạp lentivirus để biểu hiện hLAG3 tái tổ hợp (số truy cập NCBI NP_002277.4) hoặc LAG3 của khỉ (mfLAG3) [trình tự của khỉ cynomolgus *Macaca fascicularis* số truy cập XP_005570011.1, được biến đổi để thay thế “X” ở vị trí axit amin 74 với prolin trên cơ sở trình tự của Rhesus macaque (*Macaca mulata*) số truy cập NCBI XP_001108923.1) (SEQ ID NO: 576). Dòng tế bào HEK293 ban đầu, mà không có sự biểu hiện phát hiện được nào của LAG3 bởi sự phân loại tế bào được hoạt hoá huỳnh

quang (FACS), có trong thử nghiệm như đối chứng gắn kết cơ sở. Các IgG4 và hIgG4 của người không liên quan có dưới dạng lớp kháng thể đối chứng.

Các thử nghiệm được thực hiện theo quy trình sau. Tráng một lần tế bào từ ba dòng tế bào được mô tả ở trên trong dung dịch đệm 1xPBS mà không có $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ tiếp theo ủ 10 phút ở 37°C với dung dịch phân ly tế bào không chứa enzym. Rửa một lần tế bào tách ra bằng 1xPBS với $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ và đếm bằng thiết bị đếm tế bào Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience). Khoảng 10.000 tế bào trên mỗi giếng trong dung dịch đệm rửa tế bào được gieo vào trong các đĩa điện cực cacbon 96 giếng (đĩa gắn kết cao MULTI-ARRAY, MSD) và ủ trong 1 giờ ở 37°C để cho phép tế bào kết dính. Các vị trí gắn kết không đặc hiệu được phong bế bởi BSA 2% (trọng lượng/thể tích) trong PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Thêm ba lần dung dịch chứa kháng thể kháng LAG3 trong các dung dịch pha loãng theo loạt theo loạt nằm trong khoảng từ 1,7pM đến 100nM, và dung dịch không có mặt kháng thể vào tế bào được gắn kết trên đĩa, và ủ đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, rửa đĩa để loại bỏ các kháng thể không được gắn kết bằng cách sử dụng máy rửa đĩa AquaMax2000 (MDS Analytical Technologies). Các kháng thể được gắn kết trên đĩa được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG của người được liên hợp SULFO-TAG™ (MSD) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, hiện đĩa bằng Read Buffer (MSD) theo quy trình khuyến nghị của nhà sản xuất và ghi lại tín hiệu phát quang bằng thiết bị SECTOR Imager 6000 (MSD). Phân tích tín hiệu gắn kết trực tiếp (theo đơn vị ánh sáng tương đối – RLU) dưới dạng chức năng của nồng độ kháng thể và so khớp dữ liệu với mô hình đáp ứng liều sigma (logistic bốn tham số) bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism™. Hiệu lực của mỗi kháng thể được xác định bằng cách tính toán EC_{50} . EC_{50} để gắn kết tế bào HEK293-hLAG3 và HEK293-mfLAG3 được xác định là nồng độ của kháng thể mà ở đó 50% tín hiệu gắn kết tối đa được phát hiện. Tỷ lệ tín hiệu được phát hiện bằng 100nM kháng thể gắn kết với tế bào HEK293-hLAG3 hoặc HEK293-mfLAG3 so với tế bào ban đầu HEK293 được ghi lại dưới dạng chỉ thị về độ đặc hiệu gắn kết LAG3. Đối với các tỷ lệ thấp hơn 2 lần ở nồng độ kháng thể cao nhất (100nM), kháng thể được kết luận là không đặc hiệu (NS).

Kết quả gắn kết được tổng kết trong Bảng 12.

Bảng 12: Sự gắn kết của kháng thể với tế bào biểu hiện quá mức hLAG3 hoặc mfLAG3

Ab ID	Hiệu lực gắn kết tế bào với tế bào HEK293- hLAG3 EC50(M)	Hiệu lực gắn kết tế bào với tế bào HEK293- mLAG3 EC50(M)	Tỷ lệ 100nM kháng thể gắn kết HEK293- hLAG3 với tế bào HEK293	Tỷ lệ 100nM kháng thể gắn kết HEK293- mLAG3 với tế bào HEK293
H4sH15462P	8,53E-10	NS	6,8	NS
H4sH15482P	1,13E-08	NS	4,5	NS
H4sH15479P	1,34E-08	NS	17,8	NS
H4sH15498P2	2,87E-09	2,00E-08	99,8	32,7
H4sH14813N	2,03E-08	NS	19,8	NS
H4H14813N	1,99E-08	NS	8,9	NS
H4H15462P	6,85E-09	NS	2,3	NS
H4H15482P	2,47E-08	NS	7,4	NS
H4H15479P	5,20E-08	7,39E-08	20,1	2,1
H4H15498P2	2,95E-09	9,68E-09	38,8	13,8
H4H17828P2	1,2E-09	1,31E-08	8,7	6
H4H17826P2	3,48E-09	7,85E-09	7	4,7
H4H17823P	1,5E-09	2,78E-08	5,3	2,8
H4H15483P	1,72E-08	NS	6,6	NS
H4H17819P	6,9E-10	4,02E-08	22,7	8,3
Lớp kháng thể đối chứng H4H	NS	NS	NS	NS
Lớp kháng thể đối chứng H4sH	NS	NS	NS	NS
Kháng thể đối chứng 1	4,03E-09	NS	7,7	NS
Kháng thể đối chứng 2	6,77E-09	NS	8,1	NS

NS=không đặc hiệu – tỷ lệ ở 100nM ab <2

Như được thể hiện trong Bảng 12, hiệu lực của các kháng thể tính theo trị số EC_{50} nằm trong khoảng từ 690pM đến 52nM để gắn kết với tế bào HEK293-hLAG3, với tất cả các kháng thể có sự gắn kết đặc hiệu > 2 lần gắn kết với tế bào biểu hiện LAG3 của người so với tế bào HEK293 ban đầu với sự gắn kết 100nM kháng thể. Chỉ có bảy trong số các kháng thể gắn kết đặc hiệu với tế bào HEK293-mfLAG3 với trị số EC_{50} nằm trong khoảng từ 7,9nM đến 74nM. Hiệu lực gắn kết của kháng thể so sánh trên tế bào HEK293-hLag3 là khoảng 4,0nM và 7,0nM. Các kháng thể so sánh không thể hiện sự gắn kết đặc hiệu với tế bào HEK293-mfLag3. Các kháng thể đối chứng không tương quan gắn kết với tế bào HEK293-hLAG3 và HEK293-mfLAG3 không đặc hiệu như mong đợi, với lớp kháng thể đối chứng H4H và lớp kháng thể đối chứng H4sH gắn kết với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1,1 lần gắn kết cao hơn tế bào ban đầu HEK293.

Ví dụ 7: Phong bế sự gắn kết của LAG3 với MHC nhóm II trong thử nghiệm kết dính tế bào

Thử nghiệm kết dính tế bào được thực hiện để đo khả năng của kháng thể đơn dòng kháng LAG3 phong bế tế bào biểu hiện MHCII của người hoặc MHCII của chuột nhắt (lần lượt là tế bào RAJI và A20) không cho kết dính với tế bào HEK293 biểu hiện hLAG3 gắn trên đĩa vi chuẩn (trên cơ sở thử nghiệm được mô tả trong tài liệu Eur J Immunol. 1995, **25**: 2718-21 bởi Huard, và cộng sự).

Các dòng tế bào ổn định HEK293 (ATCC, #CRL-1573) được tạo ra bằng cách chuyển nạp lentivirus để biểu hiện hLAG3 tái tổ hợp (số truy cập NCBI NP_002277.4) hoặc LAG3 của chuột nhắt (mLAG3) (số truy cập GenBank NP_032505.1). Dòng tế bào HEK293 ban đầu không có sự biểu hiện phát hiện được của LAG3 của người bởi kỹ thuật phân loại tế bào được hoạt hoá huỳnh quang (FACS) và được sử dụng để chứng minh yêu cầu LAG3 để kết dính tế bào RAJI và A20 biểu hiện MHCII.

Các thử nghiệm được thực hiện theo quy trình sau: rửa một lần tế bào biểu hiện HEK293-hLAG3 hợp dòng phụ bằng 1X PBS, trypsin hoá, và ly tâm ở tốc độ 1.200 vòng/phút trong 5 phút. Tạo huyền phù lại viên tế bào trong 1X PBS và tiếp theo đếm để xác định số lượng tế bào. Số lượng tế bào thích hợp được phân lập và được tạo huyền phù lại trong môi trường đầy đủ (DME + FBS 10% + penixilin/streptomycin/glutamin), sao cho mỗi giếng sẽ chứa 100 μ L $1,2 \times 10^4$ tế bào. Phủ

tế bào vào trong đĩa đáy quang màu đen vô trùng Nunclon™ Delta 96-Well MicroWell™ (Thermo Scientific). Các giếng ở phần chu vi của đĩa không có trong thiết kế thử nghiệm để tránh tác dụng mép. Thay vì tế bào, thêm 100μL 1xPBS vào các giếng theo chu vi. Ủ tế bào HEK293-hLAG3 được phủ qua đêm ở 37°C, ở 5% CO₂. Sau khi ủ, xử lý tế bào này bằng kháng thể kháng LAG3 và lớp kháng thể đối chứng.

Vào ngày xử lý, tất cả các kháng thể được pha loãng theo loạt (1:3) trong môi trường RPMI (không chứa FBS hoặc thành phần bổ sung). Dung dịch pha loãng 9 điểm nằm trong khoảng từ 45pM đến 300nM, với điểm pha loãng sau cùng không chứa mAb. Để thử nghiệm các kháng thể H4sH trong thử nghiệm kết dính bằng cách sử dụng tế bào RAJI dung dịch pha loãng 9 điểm nằm trong khoảng từ 23pM đến 150nM, với điểm pha loãng sau cùng không chứa mAb. Thể tích cuối cùng 50μL kháng thể kháng LAG3 hoặc lớp kháng thể đối chứng được bổ sung vào tế bào HEK293-hLAG3 và ủ trong 1 giờ ở 37°C, ở 5% CO₂. Trong khi tế bào HEK293-LAG3 được phủ đang ủ với các kháng thể thử nghiệm hoặc đối chứng, tế bào B không kết dính (RAJI hoặc A20) được đánh dấu bằng Calcein AM bằng cách sử dụng quy trình sau. Thu gom tế bào huyền phù RAJI và A20 và ly tâm ở tốc độ 1.200 vòng/phút trong 5 phút. Tạo huyền phù lại viên tế bào trong 1X PBS và đếm. Rửa tế bào bằng RPMI, và tạo huyền phù lại trong RPMI ở nồng độ 10⁶ tế bào/1ml. Đánh dấu tế bào bằng cách thêm 5μL Calcein AM trên mỗi 1ml huyền phù tế bào và ủ trong 30 phút ở 37°C, ở 5% CO₂. Rửa tế bào đánh dấu 1 lần bằng RPMI, ly tâm, rửa bằng 1X PBS và tạo huyền phù lại trong PBS ở nồng độ 5x10⁶ tế bào/1ml. Tiếp theo, thêm 10μL BD Pharmingen Fc Block (0,5mg/mL) vào mỗi 1ml tế bào đánh dấu Calcein AM, mà được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Tạo huyền phù lại tế bào, RAJI hoặc A20 phong bế Fc nhuộm Calcein AM trong RPMI đến nồng độ cuối cùng 3x10⁶ tế bào trên mỗi 1ml và tiếp theo được sử dụng trong thử nghiệm kết dính.

Khi kết thúc việc xử lý kháng thể LAG3 một giờ của tế bào HEK293-LAG3, thêm 50μl tế bào RAJI hoặc A20 được đánh dấu vào mỗi giếng ở mật độ 1,5x10⁵ tế bào/giếng. Ủ tế bào huyền phù đánh dấu bằng một lớp HEK293 trong 1 giờ ở 37°C, ở 5% CO₂. Rửa loại bỏ tế bào không kết dính bằng cách rửa nhẹ các giếng 4 lần bằng RPMI, các đĩa thấm tách bằng tháp giấy sau mỗi lần rửa, tiếp theo rửa 2 lần bằng PBS. Thêm thể tích cuối cùng 200μl PBS vào mỗi giếng và đọc huỳnh quang Calcein AM ở

bước sóng kích thích/phát ra 485nm/535nm trên bộ đọc đĩa đa đánh dấu VICTOR™ X5. Các trị số IC₅₀ được tính toán bằng cách sử dụng phương trình logitit bốn tham số qua đường cong đáp ứng 9 điểm bằng cách sử dụng GraphPad Prism. IC₅₀ được xác định là nồng độ kháng thể mà ở đó sự phong bế 50% kết dính tế bào HEK với tế bào RAJI hoặc A20 được quan sát.

Đánh giá khả năng kháng thể kháng LAG3 phong bế sự gắn kết của LAG3 với cả MHCII của người và của chuột bằng cách sử dụng thử nghiệm kết dính trên cơ sở tế bào. Thử nghiệm sử dụng dạng tế bào biểu hiện nội sinh MHCII đánh dấu huỳnh quang [MHCII (RAJI của người) hoặc MHCII (A20) của chuột nhắt] gắn kết với tế bào được thao tác để biểu hiện LAG3 của người. Khả năng kháng thể LAG3 phong bế sự tương tác này được đánh giá và kết quả được thể hiện trong Bảng 13.

Bảng 13: Trị số IC₅₀ của kháng thể kháng LAG3 để phong bế sự kết dính tế bào RAJI và A20 với tế bào HEK293-hLAG3

Ab ID#	Thử nghiệm kết dính	
	RAJI	A20
	IC50 [M]	IC50 [M]
H4sH15462P	2,50E-09	3,60E-09
H4H15462P	3,20E-09	7,10E-09
H4sH15479P	9,60E-09	6,30E-09
H4H15479P	3,10E-08	1,10E-08
H4sH15482	3,30E-09	3,80E-09
H4H15482P	1,50E-08	1,10E-08
H4sH15498P2	1,60E-08	2,10E-08
H4H15498P2	1,50E-08	3,00E-08
H4sH14813N	6,00E-09	1,00E-08
H4H14813N	1,70E-08	1,00E-08
H4H17828P2	1,10E-08	1,60E-08
H4H17826P2	2,70E-08	1,00E-08
H4H17823P	8,60E-09	9,40E-09
H4H15483P	1,90E-08	1,60E-08
H4H17819P	1,70E-08	1,60E-08

Lớp kháng thể đối chứng	-	-
Kháng thể so sánh 1	3,40E-09	5,10E-09
Kháng thể so sánh 2	7,20E-09	9,60E-09

Như được thể hiện trong Bảng 13, lớp kháng thể đối chứng không chứng minh sự phong bế đo được bất kỳ sự gắn kết của tế bào RAJI hoặc A20 với tế bào HEK293-hLAG3. Tất cả các kháng thể LAG3 theo sáng chế phong bế 92 đến 98% sự kết dính của tế bào RAJI hoặc A20 với tế bào HEK293-hLAG3 ở nồng độ kháng thể cao nhất, với trị số IC50 nằm trong khoảng từ 2,5nM đến 31nM đối với sự kết dính tế bào RAJI và từ 3,6nM đến 30nM đối với sự kết dính của tế bào A20 với tế bào HEK293-hLAG3. Các trị số IC50 đối với kháng thể so sánh là 3,4nM và 7,2nM đối với sự kết dính tế bào RAJI và 5,1nM và 9,6nM đối với sự kết dính của tế bào A20 với tế bào HEK293-Lag3.

Ví dụ 8: Phong bế sự điều hòa giảm tế bào T do LAG3 gây ra trong thử nghiệm thông báo tế bào T/APC luxiferaza

Sự hoạt hoá tế bào T đạt được bằng cách kích thích các thụ thể tế bào T (TCR) mà nhận biết các peptit đặc hiệu được trình diện bởi protein phức hợp tương thích mô chính nhóm I hoặc II (MHCI hoặc MHCII) trên tế bào trình diện kháng nguyên (APC) (Goldrath và cộng sự 1999, *Nature* 402, 255-262). Các TCR được hoạt hoá lần lượt khơi mào tăng sự kiện truyền tín hiệu mà có thể được theo dõi bởi các gen thông báo được điều khiển bởi các yếu tố phiên mã như chất hoạt hoá-protein 1 (AP-1), Yếu tố nhân của tế bào T hoạt hoá (NFAT) hoặc yếu tố tăng cường chuỗi nhẹ kappa của yếu tố nhân của tế bào B hoạt hoá (NFκB). Đáp ứng tế bào T được nhận biết qua sự ăn khớp của các đồng thụ thể được biểu hiện liên tiếp hoặc cảm ứng trên tế bào T. Một thụ thể này là LAG3, chất điều hòa âm hoạt tính tế bào T. LAG3 tương tác với phối tử của nó, MHCII, mà được biểu hiện trên tế bào đích bao gồm APC hoặc tế bào ung thư, và ức chế sự hoạt hoá tế bào T bằng cách tắt tín hiệu dương tính giảm được tạo ra bởi TCR signalosome (Workman và cộng sự 2002, *J Immunol* 169:5392-5395).

Để mô tả đặc điểm khả năng kháng thể kháng LAG3 tạo đối kháng truyền tín hiệu do LAG3 gây ra trong tế bào T, thử nghiệm thông báo tế bào T LAG3/APC được thực hiện để đo việc truyền tín hiệu tế bào T do sự tương tác giữa APC và tế bào T gây ra bằng cách dùng môi trường nuôi cấy hỗn hợp được tạo ra từ hai dòng tế bào của

động vật có vú: tế bào T có nguồn gốc từ Jurkat (đơn dòng JRT3.T3.5, như được mô tả dưới đây) và các APC được thao tác trong nền HEK293 (như được mô tả dưới đây) (Fig.1).

Đối với thành phần thứ nhất, dòng tế bào T dùng cho thử nghiệm sinh học thông báo tế bào T LAG3/APC được thực hiện như sau: đơn dòng tế bào T có nguồn gốc từ Jurkat, JRT3.T3.5 (ATCC, # TIB-153) ban đầu được chuyển nạp với chất thông báo Cignal Lenti AP-1 Luc (Qiagen – Sabiosciences, #CLS-011L) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Lentivirus mã hoá gen luxiferaza đom đóm dưới sự điều khiển của trình tự khởi đầu phiên mã CMV tối thiểu, các đoạn lặp đôi của phần tử đáp ứng phiên mã cảm ứng TPA (TRE) và gen kháng puromycin. Sau khi lựa chọn kháng sinh, nhóm kháng puromycin chứa tế bào thông báo còn được thao tác bởi quá trình truyền với CD28 của người (NP_006130.1), tiểu đơn vị Ob2F3 TCR alpha và beta (Alpha AGA92550.1 Beta AAA61026.1), thể khảm LAG3 của người (bao gồm miền ngoại bào của LAG3 của người (NP_002277.4) và miền xuyên màng/miền tế bào chất của CD300a của người (các axit amin từ 181 đến 299; số truy cập NP 009192.2) và PD-1 của người (số truy cập NP_005009.2). Sự biểu hiện của các protein được xác nhận bởi phân tích FACS sau mỗi vòng chuyển nạp. Tiếp theo, một dòng thể khảm JRT3.T3/AP1-Luc/CD28/hLAG3-CD300a/dòng hPD-1 2D2 được tạo ra và được sử dụng trong thử nghiệm sinh học thông báo tế bào T/APC. Dòng tế bào được duy trì trong RPMI + FBS 10% + penixilin/streptomycin/glutamin (P/S/G) được bổ sung 100ug/mL hygromycin + 500ug/mL G418 + 1ug/mL puromycin, do đó được gọi là môi trường lựa chọn. Các tế bào trong bản mô tả này được gọi là tế bào T thông báo.

Đối với thành phần thứ hai, dòng tế bào APC dùng cho thử nghiệm sinh học thông báo tế bào T LAG3/APC được tạo ra như sau: dòng tế bào HEK293 ổn định (ATCC, # CRL-1573) biểu hiện CD20 của người (số NP_068769.2) được chuyển nạp với người với các tiểu đơn vị MHCII, HLA-DR2A (NP_061984.2) và HLA-DR2B (NP_002115). Tế bào dương tính với HLA-DR2 được phân lập bằng FACS và dòng tế bào thu được, HEK293/CD20/HLA-DR2 được duy trì trong DME + 10% + P/S/G + axit amin không thiết yếu được bổ sung 100ug/mL hygromycin + 500ug/mL G418, do đó được gọi là môi trường lựa chọn. Các tế bào trong bản mô tả này được gọi là tế bào APC.

Để ăn khớp tế bào T và APC để bắt đầu truyền tín hiệu TCR, hai phương pháp

được sử dụng: (1) chế độ đặc hiệu kép; và (2) chế độ xung peptit. Trong thử nghiệm sinh học này, kháng thể kháng LAG3 đã phong bế sự tương tác LAG3/MHCII và phóng thích hoạt tính tế bào T bằng cách không cho phép truyền tín hiệu ức chế được phân phối bởi đuôi tế bào chất của phân tử CD300a với sự tăng lên tiếp theo về quá trình truyền tín hiệu AP1-Luc. Sự hoạt hoá tế bào T được theo dõi bởi đầu đọc ra luxiferaza.

Chế độ đặc hiệu kép: theo chế độ này, kháng thể đặc hiệu kép gồm có một nhánh Fab mà gắn kết với CD3 trên tế bào T và Fab thứ hai gắn kết với CD20 trên tế bào HEK293 (kháng thể đặc hiệu kép CD3xCD20; ví dụ, như được bộc lộ trong tài liệu US20140088295) được sử dụng. Sự có mặt của phân tử đặc hiệu kép dẫn đến sự tạo ra synapza miễn dịch và hoạt hoá phức hợp TCR do tạo nhóm phân tử CD3 trên tế bào T được thao tác.

Một ngày trước sàng lọc, nuôi cấy tế bào T thông báo được thao tác đến 5×10^5 tế bào/mL trong môi trường lựa chọn và thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học ngày tiếp theo. Trị số EC_{50} của kháng thể kháng LAG3 được xác định với sự có mặt của nồng độ cố định của kháng thể đặc hiệu kép CD3xCD20 (100pM). Thêm các thuốc thử vào theo thứ tự sau. Pha loãng theo loạt kháng thể kháng Lag 3 và lớp kháng thể đối chứng trong RPMI1640 được bổ sung FBS 10% và penixilin/streptomycin/glutamin (môi trường thử nghiệm). Dung dịch pha loãng 10 điểm nằm trong khoảng từ 15pM đến 100nM với điểm pha loãng cuối cùng không chứa mAb, dung dịch đệm đối chứng). Thêm kháng thể được pha loãng theo loạt theo loạt này vào các giếng tương ứng trong đĩa đáy phẳng màu trắng 96 giếng chứa nồng độ cố định (100pM) của kháng thể đặc hiệu kép. Tạo huyền phù lại tế bào T thông báo được nuôi cấy qua đêm ở 2×10^6 /mL trong môi trường thử nghiệm, thêm vào kháng thể kháng LAG3 cộng với đĩa chứa kháng thể đặc hiệu kép và ủ trong 30 phút ở $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Nồng độ cuối cùng của tế bào T thông báo là 5×10^4 /giếng.

Tiếp theo, rửa tế bào APC 1 lần bằng D-PBS (Irvine Scientific Cat# 9240), tạo trypsin hoá (Specialty Media Cat# SM-2004-C) và phong bế bằng môi trường thử nghiệm. Sau khi ly tâm, tạo huyền phù lại tế bào đến 4×10^5 /mL trong môi trường thử nghiệm và thêm vào đĩa chứa tế bào thông báo tế bào T được ủ với kháng thể kháng LAG3 cộng với kháng thể đặc hiệu kép. Nồng độ cuối cùng của tế bào APC là 1×10^4 /giếng. Ủ đĩa trong 4 đến 6 giờ ở 37°C , 5% CO_2 . Phát hiện hoạt tính AP1-Luc

sau khi thêm thuốc thử ONE-Glo™ (Promega, # E6051) và đơn vị ánh sáng tương đối (RLU) được bắt giữ trên máy đo độ sáng Victor. Tất cả các mẫu được thử nghiệm hai lần.

Chế độ xung peptit sử dụng MBP85-99: các TCR nhận biết phức hợp MHC đặc hiệu/peptit và dẫn đến hoạt hoá tế bào T. Heterodime Ob2F3 TCR được sử dụng trong thử nghiệm này đã được thông báo tương tác với protein MHCII, HLA-DR2AB, trong phức hợp với peptit MBP85-99 (Myelin Basic Protein NP_001020272; SEQ ID NO: 583).

Một ngày trước sàng lọc, tế bào T thông báo được thao tác được tạo ra như được mô tả trên đây đối với chế độ đặc hiệu kép. Tế bào APC được tạo xung qua đêm với 0,2µM peptit MBP85-99 (Celtek HLA-DR2 MBP85-99 trong DMSO, ER-15, Lot# 140411, MW 1797,1g/mol) trong môi trường nuôi cấy tế bào chứa kháng sinh tương ứng ở 37°C/5% CO₂. Các trị số EC₅₀ của kháng thể kháng LAG3 được xác định với sự có mặt của 1x10⁴ APC xung. Thêm thuốc thử vào theo thứ tự sau: kháng thể kháng LAG3 và kháng thể đối chứng được pha loãng theo loạt trong môi trường thử nghiệm. Dung dịch pha loãng theo loạt 10 điểm chứa kháng thể kháng LAG3 nằm trong khoảng từ 15pM đến 100nM với điểm pha loãng sau cùng không chứa mAb. Thêm các kháng thể vào các giếng tương ứng trong đĩa đáy phẳng màu trắng 96 giếng. Tạo huyền phù lại tế bào T thông báo được nuôi cấy qua đêm đến 2x10⁶/mL trong môi trường thử nghiệm, thêm vào đĩa và ủ trong 30 phút ở 37°C ở 5% CO₂. Nồng độ cuối cùng của tế bào T thông báo là 5x10⁴ tế bào T trên mỗi giếng. Tiếp theo, rửa tế bào APC xung peptit MBP85-99 1 lần bằng D-PBS (Irvine Scientific Cat# 9240), tạo trypsin hoá (Specialty Media Cat# SM-2004-C) và phong bế bằng môi trường thử nghiệm. Sau khi ly tâm, tạo huyền phù lại tế bào đến 4x10⁵/mL trong môi trường thử nghiệm và thêm vào kháng thể kháng LAG3 cộng với đĩa tế bào T thông báo xung peptit. Nồng độ cuối cùng của tế bào APC là 1x10⁴/giếng. Ủ đĩa thử nghiệm trong 4 đến 6 giờ ở 37°C/5% CO₂. Hoạt tính của AP1-Luc được phát hiện sau khi thêm thuốc thử ONE-Glo™ (Promega, # E6051) và đơn vị ánh sáng tương đối (RLU) được bắt giữ trên máy đo độ sáng Victor. Tất cả các mẫu được thử nghiệm hai lần.

Các trị số EC₅₀ được xác định dựa vào phương trình logistic bốn tham số qua đường cong đáp ứng 10 điểm bằng cách sử dụng GraphPad Prism. Các trị số RLU đối với mỗi kháng thể được sàng lọc được chuẩn hóa bằng cách thiết lập dung dịch pha

loãng theo loạt sau cùng không chứa mAb, đối chứng với 100%, mà theo lý thuyết thể hiện đáp ứng AP1-Luc tối đa tạo ra phân tử đặc hiệu kép (trong chế độ đặc hiệu kép) hoặc bởi các APC xung với peptit MBP85-99. Kết quả được tổng kết trong Bảng 14.

Bảng 14: Hoạt hoá phụ thuộc kháng thể kháng LAG3 của sự truyền tín hiệu AP1-Luc trong thử nghiệm sinh học tế bào T LAG3/APC

Ab ID #	EC ₅₀ [M]	
	Chế độ peptit	Chế độ đặc hiệu kép
Lớp kháng thể hIgG4	-	-
H4sH15462P	4,86E-10	1,48E-10
H4H15462P	3,44E-10	2,24E-10
H4sH15479P	1,35E-10	8,72E-11
H4H15479P	2,84E-10	1,45E-10
H4sH15482P	8,06E-10	5,18E-10
H4H15482P	2,48E-09	>100nM
H4sH15498P2	4,61E-09	>100nM
H4H15498P2	5,89E-09	6,62E-09
H4sH14813N	8,16E-10	6,88E-10
H4H14813N	1,01E-09	1,07E-09
H4H15483P	2,54E-09	3,69E-09
H4H17819P	2,12E-09	>100nM
H4H17823P	6,88E-10	>100nM
H4H17826P2	8,83E-09	2,66E-07
H4H17828P2	4,91E-09	>100nM
Kháng thể so sánh 1	2,79E-10	1,57E-10
Kháng thể so sánh 2	3,49E-10	2,38E-10

Như được thể hiện trong Bảng 14, tất cả mAb kháng Lag3 theo sáng chế mà được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học tế bào T/APC, phóng thích sự ức chế LAG3/HLA-DR2 với các trị số EC₅₀ nằm trong khoảng từ 135pM đến 8,83nM theo chế độ peptit của thử nghiệm và với trị số EC₅₀ nằm trong khoảng từ 87pM đến lớn hơn 100nM theo chế độ đặc hiệu kép của thử nghiệm, trong khi các kháng thể so sánh thể hiện các trị số EC₅₀ là 280pM và 350pM. Lớp kháng thể đối chứng được thử

nghiệm không thể hiện hoạt tính phóng thích đáng kể trong thử nghiệm sinh học. Trong thử nghiệm khác, việc thêm kháng thể kháng PD-1 (REGN 2810; được mô tả trong Ví dụ 12 trong bản mô tả này) không làm tăng cường sự phóng thích hoạt tính tế bào T.

Trong thử nghiệm thứ hai, dòng tế bào HEK293/CD20/HLA-DR2 được chuyển nạp với gen PD-L1 của người (các axit amin 1 đến 290 có số truy cập NP_054862.1) mà đã được tách dòng vào trong hệ vectơ lentivirus (pLVX). Như được mô tả trên đây, tế bào T có nguồn gốc từ Jurkat biểu hiện yếu tố thông báo luxiferaza được điều khiển bởi hLAG-3 và AP-1 được ủ với tế bào trình diện kháng nguyên dương tính với PD-L1 biểu hiện phức hợp MHC II của người/peptit. Trong thử nghiệm này, kháng thể kháng LAG-3 chỉ phóng thích hoạt tính tế bào T với sự có mặt của kháng thể kháng PD-1 (REGN2810; được mô tả trong Ví dụ 12 trong bản mô tả này), không phải trong trường hợp vắng mặt kháng thể kháng PD-1. Tóm lại, kháng thể kháng LAG-3 phóng thích sự hoạt hoá tế bào T bằng cách phong bế sự truyền tín hiệu ức chế LAG-3/MHC II và được hiệp đồng với kháng thể kháng PD-1 trong thử nghiệm tế bào T này.

Ví dụ 9: Kháng thể kháng LAG3 thể hiện sự gắn kết với tế bào T khi cynomolgus được kích thích CD4+ và CD8+

Trong ví dụ này, khả năng kháng thể kháng LAG3 đã chọn gắn kết với tế bào T khi cynomolgus CD4+ và/hoặc CD8+ biểu hiện LAG3 qua FACS được đánh giá.

Trước tiên, phân lập tế bào T từ dòng máu chung của khỉ cynomolgus (Bioreclamation, Westbury, NY). Tóm lại, dòng máu chung từ hai khỉ cho cynomolgus được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 trong PBS và tạo lớp qua dung dịch 85% Ficoll-Paque. Theo các quy trình tiêu chuẩn, tế bào hồng cầu được phân tách với tế bào đơn nhân và tế bào T được phân lập bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào panT (Miltenyi Biotech).

Tế bào T phân lập được hoạt hoá bằng cách sử dụng kit hoạt hoá/mở rộng tế bào T đối với động vật linh trưởng không phải người (Miltenyi Biotech). Tạo huyền phù lại hỗn hợp viên tế bào ở nồng độ 1×10^6 tế bào/mL trong môi trường đầy đủ. Sau 72 giờ ủ, loại bỏ viên tế bào và tế bào T hoạt hoá được mở rộng trong môi trường đầy đủ trong 96 giờ.

Tiếp theo, tế bào T khỉ cynomolgus được kích thích từ mỗi khỉ cho, như được mô tả ở trên, được nhuộm bằng thuốc nhuộm LIVE/DEAD (Molecular Probes) để phân biệt giữa tế bào sống và tế bào chết qua FACS. Tiếp theo, đồng ủ tế bào với kháng thể kháng CD8 liên hợp PE và kháng thể kháng CD4 liên hợp FITC trong 15 phút trên nước đá để cho phép phát hiện quần thể tế bào dương tính và âm tính CD4 và CD8.

Để đánh giá sự gắn kết của kháng thể kháng LAG3 với tế bào T khỉ cynomolgus CD4⁺ và CD8⁺ được phân lập trước, kháng thể kháng LAG3 và lớp kháng thể đối chứng được pha loãng theo loạt trong dung dịch đệm phong bế và phủ trong đĩa đáy chữ V 96 giếng với các liều cuối cùng nằm trong khoảng từ 100nM đến 50pM. Tiếp theo, các kháng thể được pha loãng theo loạt được đánh dấu trực tiếp bằng cách sử dụng Zenon Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes) và ủ với huyền phù tế bào T CD4⁺/CD8⁺ của khỉ cynomolgus trong 15 đến 30 phút trên nước đá. Ly tâm tế bào và rửa viên bằng chất đệm nhuộm để loại bỏ các kháng thể không gắn kết và cố định trong 12 giờ với dung dịch pha loãng với tỷ lệ 1:1 chứa Cytofix (BD Biosciences) và dung dịch đệm nhuộm. Sau khoảng thời gian ủ, loại bỏ dung dịch đệm cố định và tạo huyền phù lại viên trong dung dịch nhuộm, lọc, và được sử dụng để đo huỳnh quang.

Việc đo huỳnh quang đạt được trên Fortessa (Becton Dickinson) và dữ liệu được phân tích trong FlowJo để xác định cường độ huỳnh quang trung bình (MFI). Các trị số EC₅₀ được tính toán từ phương trình logistic bốn tham số qua đường cong đáp ứng 11 điểm bằng cách sử dụng GraphPad Prism. Tỷ lệ MFI đối với mỗi kháng thể được tính toán bằng cách chia MFI ở 11,1nM cho MFI ở 0nM nồng độ kháng thể (đối chứng âm tính).

Bảng 15: Tỷ lệ EC₅₀ và MFI của kháng thể kháng LAG3 đã chọn gắn kết với tế bào T khỉ cynomolgus CD4⁺ và CD8⁺ từ nhiều khỉ cho

FACS gắn kết trên quần thể tế bào T kích thích	Khỉ cho cynomolgus 1				Khỉ cho cynomolgus 2			
	CD4 ⁺		CD8 ⁺		CD4 ⁺		CD8 ⁺	
	EC ₅₀ [M]	Tỷ lệ của MFI (11nM /0nM)	EC ₅₀ [M]	Tỷ lệ của MFI (11nM /0nM)	EC ₅₀ [M]	Tỷ lệ của MFI (11nM /0nM)	EC ₅₀ [M]	Tỷ lệ của MFI (11nM /0nM)

H4sH15482P	1,20E-09	1,3	4,60E-10	3	3,80E-10	1,3	4,10E-10	4,7
H4sH14813N	4,20E-10	1,3	8,50E-11	3,5	2,20E-10	1,5	1,10E-10	6,3
Kháng thể so sánh 1	NB	1,1	9,20E-10	2,4	NB	1,2	7,80E-10	4,2
Lớp kháng thể đối chứng hIgG4	NB	1	NB	1	NB	1	NB	1

NB: không gắn kết

Như được thể hiện trên đây, kháng thể kháng LAG3 H4sH15482P và H4sH14813N thể hiện sự gắn kết với dòng tế bào LAG3-HEK293 của khỉ cynomolgus được thao tác di truyền. Trong ví dụ này, H4sH15482P và H4sH14813N chứng minh sự gắn kết đặc hiệu với tế bào T của khỉ cynomolgus biểu hiện CD4+ và CD8+ LAG3 với EC₅₀ nằm trong khoảng từ 1,1nM đến 85pM (Bảng 15). Tóm lại, kháng thể kháng LAG3 đã chọn được mô tả trong ví dụ này gắn kết thể hiện khả năng phản ứng chéo với LAG3 được biểu hiện trên tế bào T CD4+ và CD8+ hoạt hoá của khỉ cynomolgus. Trái lại, kháng thể so sánh 1 chứng minh sự gắn kết chỉ với tế bào T khỉ cynomolgus CD8+.

Ví dụ 10: Hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 kháng khối u Colon26

Hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của chuột đơn lẻ và kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của chuột được nghiên cứu trong mô hình khối u hiệp đồng cận lâm sàng Colon 26.

Mua chuột nhắt BALB/c từ Taconic Biosciences. Colon 26, dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến của chuột nhắt có nguồn gốc từ chủng chuột BALB/c, được mua từ Bộ lưu trữ giống chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection-ATCC). Năm mươi chuột nhắt BALB/c được ghép dưới da với 1x10⁶ tế bào Colon 26 (dòng ung thư biểu mô tuyến của chuột nhắt có nguồn gốc từ chủng BALB/c) vào Ngày 0. Vào Ngày 8, bốn mươi chuột nhắt có thể tích khối u trung bình 50mm³ được chọn và được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm điều trị (N=10/nhóm). Vào các ngày 14, 17, 21, 24 và 28,

chuột nhất được cho dùng liệu kháng thể như sau: Nhóm 1, lớp kháng thể đối chứng IgG2a của chuột cống (dòng 2A3, BioXCell, Catalog # BE0089) và lớp kháng thể đối chứng mIgG1 (dòng MOPC-21, BioXCell, Catalog # BE0083); Nhóm 2, kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt (kháng thể IgG2a của chuột đồng kháng PD-1 của chuột nhắt, dòng RPMI-14, BioXCell, catalog # BE0089) và lớp kháng thể đối chứng mIgG1; Nhóm 3, kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt (kháng thể IgG1 của chuột cống kháng LAG3 của chuột nhắt, dòng C9B7W, BioXCell, Catalog # BE0174) và kháng thể đối chứng IgG2a của chuột nhắt; Nhóm 4, kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt và kháng LAG3 của chuột cống. Tất cả các kháng thể được dùng bằng việc tiêm trong bụng ở 10mg/kg. Theo dõi thể tích khối u bằng việc đo bằng compa hai lần mỗi tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm (42 ngày).

Quan sát việc giảm đáng kể sự phát triển khối u ở chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt (các hình vẽ Fig.2A-Fig.B), với 5 trong số 10 chuột nhắt trở thành không có khối u vào ngày 45 khi kết thúc thử nghiệm. Sự giảm phát triển khối u cũng được quan sát trong nhóm phụ của chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt, với 3 trong số 10 chuột nhắt trở thành không có khối u vào ngày 45. Trái lại, việc điều trị kết hợp với kháng thể kháng LAG3 và kháng PD-1 tốt hơn so với liệu pháp đơn, với 8 trong số 10 chuột nhắt trở thành không có khối u khi kết thúc thử nghiệm, cho biết tác dụng cộng hợp tiềm năng của việc điều trị bằng kháng thể kháng LAG3 và kháng PD-1. Không có chuột nhắt không có khối u khi kết thúc thử nghiệm trong nhóm đối chứng. Vào ngày 35, có sự giảm thể tích khối u đáng kể về mặt thống kê ở chuột nhắt được điều trị với liệu pháp kết hợp ($p < 0,05$, Fig.2B) nhưng không giảm đáng kể với liệu pháp điều trị đơn. Bất chấp sự thanh thải khối u hiệu quả, không có bằng chứng nào về việc giảm thể trọng được quan sát thấy (không được thể hiện). Do đó, trong mô hình khối u Colon 26 được xác định, chế độ kết hợp của kháng thể kháng PD-1 và kháng thể kháng LAG3 có hiệu quả hơn đáng kể so với các liệu pháp đơn tương ứng.

Hoạt tính in vivo của kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt và kháng LAG3 của chuột nhắt cũng được nghiên cứu trong các mô hình khối u hiệp đồng cận lâm sàng 4T1, RENCA và A20. Việc điều trị kết hợp với cả hai kháng thể dẫn đến ít nhất tác dụng kháng khối u cộng hợp so với việc điều trị một kháng thể (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 11: Hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt kháng khối u MC38

Tác dụng phong bế kép của PD-1 và LAG3 được thử nghiệm kháng khối u MC38 đã được xác định ở chuột nhắt C57BL/6 bằng cách sử dụng kháng thể phong bế kháng PD-1 của chuột nhắt và kháng LAG3 của chuột nhắt.

Mua chuột nhắt C57BL/6 từ Taconic Biosciences, dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến của chuột nhắt, MC38, thu được từ chủng chuột nhắt C57BL/6, thu được từ kho lưu trữ của Viện y tế quốc gia. Kháng thể kháng LAG3 và kháng PD-1 cũng như các kháng thể đối chứng thu được như được mô tả trong Ví dụ 10.

Năm mươi chuột nhắt C57BL/6 được ghép dưới da với 3×10^5 tế bào MC38 vào trong sườn vào Ngày 0. Vào Ngày 8, năm mươi chuột với thể tích khối u trung bình 45 mm^3 được chọn và được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm điều trị ($N=10/\text{nhóm}$). Vào ngày 8, 12, 15, 19 và 23, chuột nhắt được cho dùng liều với các kháng thể như sau: Nhóm 1, lớp kháng thể đối chứng IgG2a và mIgG1 của chuột cống; Nhóm 2, kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt và mIgG1; Nhóm 3, kháng thể kháng LAG3 của chuột nhắt và IgG2a của chuột cống; Nhóm 4, kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt và kháng LAG3 của chuột nhắt. Tất cả các kháng thể được cho dùng ở 10 mg/kg bằng việc tiêm trong bụng. Kiểm tra thể tích khối u bằng việc đo bằng compa hai lần mỗi tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm (28 ngày).

Liệu pháp kháng thể kháng PD-1 làm giảm đáng kể sự phát triển khối u trong nhóm chuột nhắt ($p < 0,0001$; ngày 23) (các hình vẽ Fig.3A-Fig.B), với 2 trong số 10 chuột nhắt trở thành không có khối u khi kết thúc thử nghiệm. Liệu pháp đơn kháng thể kháng LAG3 không thể hiện tác dụng kháng khối u đáng kể bất kỳ (0/10 chuột nhắt không có khối u khi kết thúc thử nghiệm), trong khi tổ hợp của kháng thể kháng LAG3 và kháng PD-1 tốt hơn so với một mình liệu pháp kháng PD-1 chỉ biểu thị tác dụng hiệp đồng.

Để thử nghiệm các đặc tính điều biến miễn dịch của kháng thể kháng PD-1 và kháng thể kháng LAG3 trong tổ hợp, các chất đánh dấu tế bào T trong lá lách và hạch bạch huyết được làm kiệt (DLN) của chuột nhắt điều trị được kiểm tra (Fig.4). Lá lách và hạch bạch huyết được làm kiệt của chuột nhắt mang khối u được loại bỏ bằng cách cắt và đặt vào trong 15 mL môi trường RPMI1640 Glutamax I (Invitrogen). Tổng ARN

được phân lập và thực hiện việc phân tích RT-PCR Taqman bằng cách sử dụng hỗn hợp đoạn mồi/đầu dò đặc hiệu đối với CD8 β của chuột nhắt [đầu dò: AGCAGCTCTGCCCTCAT (SEQ ID NO: 584), đoạn mồi thuận: GCTCTGGCTGGTCTTCAGTATG (SEQ ID NO: 585), đoạn mồi nghịch: TTGCCGTATGGTTGGTTTGAAC (SEQ ID NO: 586)] và IFN γ của chuột (Mm01168134_m1, Applied Biosystems). Các mẫu được chuẩn hóa đến mức biểu hiện phiên mã xyclophilin B của chuột nhắt. Việc phân tích TaqMan đã chứng minh sự mở rộng tế bào T CD8 $^{+}$ trong cả DLN và lá lách của chuột nhắt trong nhóm điều trị kết hợp, cũng như sự sản xuất phân tử phản ứng lại kích thích tế bào T làm tăng IFN γ trong cả động vật được điều trị kháng PD-1 kết hợp và đơn lẻ, biểu thị rằng sự phong bế PD-1 và LAG3 làm tăng sự tăng sinh tế bào và chức năng phản ứng lại kích thích của tế bào T.

Ví dụ 12: Hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng LAG3 của người kháng lại khối u MC38

Trong thử nghiệm này, hiệu quả của kháng thể kháng LAG3 của người làm ví dụ của sáng chế kháng lại khối u MC38 được nghiên cứu. Các mAb kháng LAG3 của người không gắn kết với LAG3 của chuột nhắt. Do đó, để nghiên cứu các đặc tính kháng khối u của các kháng thể này *in vivo* ở chuột nhắt, chuột nhắt được làm giống người để biểu hiện protein LAG3 của người được sử dụng. Đối với các thử nghiệm trong bản mô tả này, chuột được làm giống người kép mà biểu hiện phần ngoại bào của PD-1 của người và LAG3 của người và các phần xuyên màng và phần nội bào của chuột có các protein này được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật VelociGene® (Valenzuela và cộng sự 2003; Nat. Biotechnol. 21: 652-659).

Chuột nhắt LAG3/PD-1 kép được làm giống người được thao tác di truyền bằng cách sử dụng kỹ thuật VelociGene® để thay thế các miền ngoại bào của các gen *Pdcd1* và *Lag3* của chuột nhắt với các vùng tương ứng của các gen PD-1 của người và LAG3 của người (đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 62/258,181, nộp ngày 20 tháng 11 năm 2015). Sự biểu hiện của PD-1 được làm giống người và LAG3 được đánh giá bằng cách thử nghiệm sự biểu hiện của PD-1 và protein LAG3 trên tế bào T của chuột được làm giống người sau khi kích thích kháng thể kháng CD3/kháng CD28. Sự tương tác PD-1 và protein LAG3 của người với các phối tử tương ứng của chuột nhắt được xác nhận bằng cách thử nghiệm sự gắn kết của LAG3 của người với MHC II của chuột

nhất trong thử nghiệm kết dính tế bào và sự gắn kết của PD-1 của người với PD-L1 của chuột nhất trong thử nghiệm gắn kết SPR-Biacore.

Kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được sử dụng trong nghiên cứu này là kháng thể đầy đủ của người mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 của người và bao gồm HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432 và HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 418/426 (còn được gọi là H4sH15482P và dưới đây được gọi là “mAb1”).

Kháng thể kháng PD-1 của người được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20150203579, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó. Kháng thể kháng PD-1 được sử dụng trong Ví dụ này là H4H7798N (như được bộc lộ trong tài liệu US20150203579; được gọi là REGN2810. Cụ thể hơn là, H4H7798N bao gồm chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 330 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:331 như được bộc lộ trong tài liệu US20150203579). REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) gắn kết với ái lực cao với PD-1 của người và phong bế sự tương tác của PD-1 với PD-L1 và PD-L2.

Tế bào ung thư biểu mô tuyến ruột kết của chuột nhất (MC38.Ova) được thao tác di truyền để biểu hiện anbumin buồng trứng gà để làm tăng tính sinh miễn dịch khối u.

Chuột nhất LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} được cấy ghép dưới da với $1,5 \times 10^6$ tế bào MC38.Ova vào ngày 0 và được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm điều trị (N=7/nhóm). Vào các ngày 3, 6, 10, 14 và 17 chuột nhất được cho dùng mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) (25mg/kg), REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) (10mg/kg) hoặc lớp kháng thể đối chứng (25mg/kg) bằng việc tiêm trong màng bụng. Thử nghiệm khối u được theo dõi bằng việc đo bằng compa hai lần mỗi tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm (24 ngày).

Chuột nhất được làm giống người hai lần LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} được tiêm truyền với tế bào MC38.Ova vào ngày 0 và được dùng liều với mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) (25mg/kg), REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) (10mg/kg) hoặc lớp kháng thể (25mg/kg) qua đường trong màng bụng vào các ngày 3, 6, 10, 14 và 17. REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) thể hiện sự ức chế phát triển khối u riêng phần (Fig.5), với sự hồi quy khối u quan sát được ở 2 trong số 7 chuột nhất, trong khi không

có chuột nhất nào là không có khối u trong nhóm lớp kháng thể đối chứng. Liệu pháp đơn mAb1 (kháng thể hLAG3) ở 25mg/kg không thể hiện tác dụng đáng kể bất kỳ đối với sự phát triển khối u, chỉ với 1 trong số 7 chuột nhất trở thành không có khối u khi kết thúc thử nghiệm. Thể trọng của chuột nhất không bị ảnh hưởng bởi việc điều trị mAb1 (kháng thể kháng LAG3), REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) hoặc lớp kháng thể đối chứng.

Ví dụ 13: Hiệu quả *in vivo* của tổ hợp chứa kháng thể kháng LAG3 của người và kháng PD-1 của người kháng lại khối u MC38

Trong thử nghiệm này, hiệu quả của mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) kết hợp với REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) được thử nghiệm kháng lại khối u MC38.Ova ở chuột nhất LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} được làm giống người kép. Chuột được làm giống người kép được mô tả trong Ví dụ 12 trong bản mô tả này.

Kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được sử dụng trong thử nghiệm này là kháng thể đầy đủ của người mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 của người và chứa HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432 và HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 418/426 (còn được gọi là H4sH15482P và dưới đây được gọi là “mAb1”).

Kháng thể kháng PD-1 được sử dụng trong Ví dụ này là H4H7798N (như được bộc lộ trong tài liệu US20150203579; còn được gọi là REGN2810). REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) gắn kết với ái lực cao với PD-1 của người và phong bế sự tương tác của PD-1 với PD-L1 và PD-L2.

Chuột được ghép dưới da với 1×10^6 tế bào MC38.Ova vào ngày 0 và được chia ngẫu nhiên thành bốn nhóm điều trị (N=7 trong nhóm đối chứng và mỗi nhóm N=12 trong các nhóm điều trị kết hợp mAb1 (kháng thể kháng hLAG3), REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) và mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) +REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1)). Vào các ngày 3, 7, 10, 14 và 17, chuột nhất được cho dùng mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) (25mg/kg), REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) (10mg/kg), tổ hợp của mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) (25mg/kg) và REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) (10mg/kg), hoặc lớp kháng thể đối chứng (25mg/kg) bằng việc tiêm trong màng bụng. Kiểm tra thể tích khối u bằng việc đo bằng compa hai lần mỗi tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm (32 ngày) và kiểm tra động vật không có khối u đối với

sự không tái phát khối u đến 80 ngày.

Liệu pháp đơn REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) dẫn đến sự ức chế phát triển khối u (các hình vẽ Fig.6A-Fig.6B), với sự hồi quy khối u ở 2 trong số 12 (17%) động vật, trong khi mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) không có hiệu quả đáng kể, xác nhận sự phát hiện thử nghiệm trước. Sự hồi quy khối u chỉ quan sát được ở 1 trong số 12 chuột nhất được điều trị bằng mAb1 (kháng thể kháng hLAG3). Trong nhóm kháng thể đối chứng, không có chuột nào là không có khối u vào ngày 32. Trái lại, tổ hợp của mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) và REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) chứng minh sự ức chế mạnh sự phát triển khối u MC38.Ova, dẫn đến 5 trong số 12 (42%) chuột không có khối u khi kết thúc thử nghiệm. Không có chuột nhất nào là không có khối u thể hiện sự tái phát khối u trong 80 ngày sau cấy ghép, biểu thị tác dụng kéo dài của liệu pháp miễn dịch tổ hợp. ANOVA một chiều với kết quả sau thử nghiệm nhiều so sánh của Tukey biểu thị sự khác nhau đáng kể về thể tích khối u giữa các nhóm điều trị kết hợp mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) và REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) so với liệu pháp đơn mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) ($p<0,05$) hoặc lớp kháng thể đối chứng ($p<0,01$) vào ngày 22 (Fig.6B). Liệu pháp đơn REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) cũng thể hiện sự giảm phát triển khối u đáng kể tương đối với ($p<0,05$). Việc điều trị kết hợp mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) và REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) cũng dẫn đến sự cải thiện đáng kể về tỷ lệ sống của động vật ($p<0,0001$), như được phân tích bởi thử nghiệm xếp hạng nhật ký (Mantel-Cox) (Fig.6C). Thay vì hiệu quả được cải thiện của liệu pháp kết hợp, không quan sát được bằng chứng nào về việc giảm thể trọng (dữ liệu không được thể hiện). Tóm lại, tổ hợp của mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) và REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) dẫn đến hiệu quả được cải thiện bao gồm sự phát triển của khối u giảm, hệ số sạch khối u được cải thiện và sự sống được cải thiện so với các liệu pháp đơn REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) hoặc mAb1 (kháng thể kháng hLAG3).

Ví dụ 14: Các nghiên cứu theo khoảng liều của tổ hợp chứa kháng thể kháng LAG3 và kháng PD-1 kháng lại khối u MC38

Ví dụ này mô tả nhóm thử nghiệm theo khoảng liều đo hiệu quả *in vivo* của tổ hợp chứa kháng thể kháng PD-1 của người và kháng thể kháng LAG3 của người kháng lại khối u MC38.Ova ở chuột nhất LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} được làm giống người kép. Chuột được làm giống người kép được mô tả trong Ví dụ 12 trong bản mô

tả này.

Kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được sử dụng cho nghiên cứu này là kháng thể đầy đủ của người mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 của người và chứa HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:420-422-424-428-430-432 và HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 418/426 (còn được gọi là H4sH15482P và dưới đây được gọi là “mAb1”).

Kháng thể kháng PD-1 được sử dụng trong Ví dụ này là H4H7798N (như được bộc lộ trong tài liệu US20150203579; còn được gọi là REGN2810). REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) gắn kết với ái lực cao với PD-1 của người và phong bế sự tương tác của PD-1 với PD-L1 và PD-L2.

Trong thử nghiệm thứ nhất, REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) được chuẩn độ và được thử nghiệm ở mức liều 10mg/kg và 1mg/kg, cả hai nhóm liều dưới dạng chất đơn và kết hợp với mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) (25mg/kg). Kết quả của cả hai nhóm điều trị kết hợp được so với liệu pháp đơn REGN2810 (1mg/kg hoặc 10mg/kg) hoặc mAb1 (25mg/kg) để xác định nếu hiệu quả kháng khối u cộng hợp/hiệp đồng được quan sát. Việc điều trị bằng lớp kháng thể đối chứng (25mg/kg) cũng được thử nghiệm. Chuột nhắt LAG-3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} được tiêm truyền với tế bào MC38.Ova vào ngày 0 và được chia ngẫu nhiên thành sáu nhóm điều trị (N=6 trong lớp kháng thể đối chứng và N=12 trong nhóm điều trị mAb1, REGN2810, hoặc REGN2810 + mAb1). Chuột nhắt được cho dùng: mAb1 (25mg/kg); REGN2810 (10mg/kg); REGN2810 (1mg/kg); mAb1 (25mg/kg) + REGN2810 (10mg/kg); mAb1 (25mg/kg) + REGN2810 (1mg/kg); hoặc lớp kháng thể đối chứng (25mg/kg), qua việc tiêm trong màng bụng vào các ngày 3, 7, 10, 14 và 17. Kiểm tra thể tích khối u trong 36 ngày và kiểm tra động vật không có khối u đến 80 ngày.

Bảng 16 thể hiện thể tích khối u trung bình ở các thời điểm khác nhau trong nghiên cứu và số lượng chuột không có khối u ở Ngày 36 được thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 16: Thể tích khối u trung bình ở các thời điểm khác nhau

Nhóm điều trị	Thể tích khối u, trung bình mm ³ (±SEM)				
	Ngày 7	Ngày 10	Ngày 14	Ngày 17	Ngày 22

Lớp kháng thể đối chứng	24 (± 6)	54 (± 11)	104 (± 25)	269 (± 70)	749 (± 180)
mAb1 (kháng thể kháng LAG3) (25mg/kg)	27 (± 4)	53 (± 20)	83 (± 38)	155 (± 73)	451 (± 211)
R2810 (10mg/kg)	27 (± 4)	29 (± 8)	34 (± 11)	86 (± 26)	313 (± 98)
R2810 (1mg/kg)	36 (± 8)	92 (± 23)	150 (± 47)	264 (± 73)	669 (± 183)
R2810 (10mg/kg)+mAb1	25 (± 3)	10 (± 3)	4 (± 4)	8 (± 5)	38 (± 19)
R2810 (1mg/kg)+mAb1	31 (± 7)	38 (± 13)	55 (± 35)	106 (± 58)	378 (± 137)

Bảng 17: Số lượng chuột không có khối u vào Ngày 36

Nhóm	Chuột không có khối u (Ngày 36) n/N ^a (%)
Lớp kháng thể đối chứng	0/6 (0%)
REGN2810 (1mg/kg)	2/12 (16%)
REGN2810 (10mg/kg)	4/12 (33%)
mAb1 (25mg/kg)	1/12 (8%)
REGN2810 (1mg/kg) + mAb1 (25mg/kg)	3/12 (25%)
REGN2810 (10mg/kg) + mAb1 (25mg/kg)	6/12 (50%)

^an/N: # chuột không có khối u/tổng số chuột mỗi nhóm

Liệu pháp điều trị đơn REGN2810 ở 1mg/kg chỉ thể hiện sự hồi quy khối u tối thiểu trong 36 ngày, tương tự với kết quả đối với nhóm điều trị bằng lớp kháng thể đối chứng (Fig.7A-Fig.7B). 2/12 (khoảng 16%) và 0/6 (0%) chuột không có khối u ở Ngày 36 lần lượt trong nhóm REGN2810 (1mg/kg) và nhóm kháng thể đối chứng. Trái lại, các nhóm điều trị mAb1 (25mg/kg), REGN2810 (10mg/kg) và REGN2810 (1mg/kg) + mAb1 (25mg/kg) chứng minh sự giảm tương tự về sự phát triển khối u trong 22 ngày (Fig.7A). Vào Ngày 36, việc điều trị mAb1 (25mg/kg) dẫn đến 1/12 (khoảng 8%) chuột nhất không có khối u, trong khi 4/12 (khoảng 33%) và 3/12 (25%) chuột nhất không có khối u lần lượt trong nhóm REGN2810 (10mg/kg) và nhóm REGN2810 (1mg/kg) + mAb1 (25mg/kg). Tóm lại, mAb1 (25mg/kg) + REGN2810 (10mg/kg)

chứng minh sự giảm mạnh nhất về sự phát triển khối u MC38.Ova, với 6 trong số 12 (50%) chuột trở thành không có khối u vào Ngày 36. Không có chuột nào không có khối u thể hiện sự hồi quy khối u trong 80 ngày sau cấy ghép, thay vì dùng điều trị, biểu thị tác dụng kéo dài của liệu pháp miễn dịch kết hợp. Việc điều trị mAb1 (25mg/kg) + REGN2810 (10mg/kg) cũng dẫn đến sự cải thiện đáng kể về tỷ lệ sống của động vật ($p=0,0197$), như được phân tích bởi thử nghiệm xếp hạng nhật ký (Mantel-Cox) (Fig.7C). Ngoài ra, không quan sát được bằng chứng về việc giảm thể trọng.

Trong thử nghiệm thứ hai, mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) được chuẩn độ và được thử nghiệm ở mức liều 25mg/kg và 5mg/kg, cả hai nhóm liều dưới dạng một chất và kết hợp với REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) (10mg/kg). Kết quả của cả hai nhóm điều trị kết hợp được so với liệu pháp điều trị đơn mAb1 (5mg/kg hoặc 25mg/kg) hoặc REGN2810 (10mg/kg) để xác định nếu quan sát được tác dụng kháng khối u cộng hợp/hiệp đồng. Việc điều trị bằng lớp kháng thể đối chứng (25mg/kg) cũng được thử nghiệm. Chuột nhất LAG-3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} được tiêm truyền với tế bào MC38.Ova vào ngày 0 và được chia ngẫu nhiên thành sáu nhóm điều trị ($N=6$ trong nhóm kháng thể đối chứng và $N=12$ trong nhóm điều trị mAb1, REGN2810, hoặc REGN2810 + mAb1). Chuột nhất được cho dùng: mAb1 (5mg/kg); mAb1 (25mg/kg); REGN2810 (10mg/kg); mAb1 (5mg/kg) + REGN2810 (10mg/kg); mAb1 (25mg/kg) + REGN2810 (10mg/kg); hoặc lớp kháng thể đối chứng (25mg/kg), qua việc tiêm trong màng bụng vào các ngày 3, 7, 10, 14 và 17. Thể tích khối u được theo dõi trong 31 ngày.

Liệu pháp đơn mAb1 ở 5mg/kg thể hiện sự hồi quy khối u tối thiểu tương tự với nhóm điều trị bằng lớp kháng thể đối chứng. Tổ hợp của mAb1 (25mg/kg) + REGN2810 (10mg/kg) thể hiện sự giảm khối u mạnh nhất (Fig.8A). Tác dụng tiềm ẩn của tổ hợp cũng được chứng minh bởi nhóm điều trị mAb1 (5mg/kg) + REGN2810 (10mg/kg). Thể tích khối u được đo vào Ngày 23 được thể hiện trên Fig.8B. Tổ hợp của kháng thể kháng LAG-3 và REGN2810 cũng thể hiện sự cải thiện đáng kể về sự sống của động vật ($p<0,001$, như được phân tích bởi thử nghiệm log rank Mantel-Cox) (Fig.8C). Các kết quả thể hiện rằng hiệu quả tiềm ẩn của tổ hợp quan sát được thậm chí ở liều kháng thể kháng LAG3 thấp. Dựa vào các kết quả được thể hiện trong bản mô tả này, có thể không nhất thiết phải sử dụng liều cao của kháng thể kháng LAG3

kết hợp với kháng thể kháng PD-1 trong các chế độ điều trị kháng khối u.

Tóm lại, tổ hợp của REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) và mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) trong mô hình khối u MC38.ova ở chuột nhắt LAG3/PD-1 được làm giống người kép, mà cho phép việc thử nghiệm các kháng thể lâm sàng mà không phản ứng chéo với các thụ thể của chuột nhắt, chứng minh hiệu quả phụ thuộc liều được cải thiện, bao gồm sự phát triển khối u giảm và sự sống được cải thiện, so với các liệu pháp đơn REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) và mAb1 (kháng thể kháng hLAG3). Hiệu quả kháng khối u mạnh nhất của tổ hợp chứa REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) và mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) trong việc thiết lập cận lâm sàng trợ giúp cho sự phát triển lâm sàng dưới dạng liệu pháp miễn dịch ung thư kết hợp.

Ví dụ 15: Hiệu quả *in vivo* của tổ hợp kháng thể kháng LAG3 của người và kháng PD-1 của người kháng lại khối u MC38 được xác định

Trong thử nghiệm này, hiệu quả của mAb1 (kháng thể kháng hLAG3) kết hợp với REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) được thử nghiệm kháng lại khối u MC38.Ova đã được xác định ở chuột nhắt LAG3^{hum/hum}PD-1^{hum/hum} được làm giống người kép. Chuột nhắt được làm giống người kép được mô tả trong Ví dụ 12 trong bản mô tả này.

Kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được sử dụng cho nghiên cứu này là kháng thể đầy đủ của người mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 của người và chứa HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432 và HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 418/426 (còn được gọi là H4sH15482P và dưới đây được gọi là “mAb1”).

Kháng thể kháng PD-1 được sử dụng trong Ví dụ này là H4H7798N (như được bộc lộ trong tài liệu số US20150203579; còn được gọi là REGN2810). REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) gắn kết với ái lực cao với PD-1 của người và phong bế sự tương tác của PD-1 với PD-L1 và PD-L2.

Chuột nhắt LAG-3^{hum/hum} PD-1^{hum/hum} được tiêm truyền với tế bào MC38.Ova dưới da vào ngày 0. Vào ngày 10 chuột nhắt với thể tích khối u trung bình 100mm³ được chọn và được chia ngẫu nhiên thành bốn nhóm điều trị. Chuột nhắt được cho dùng tổ hợp mAb1 (25mg/kg; N=9), REGN2810 (10mg/kg; N=10), mAb1 (25mg/kg) + REGN2810 (10mg/kg) (N=11) hoặc lớp kháng thể đối chứng (25mg/kg; N=7) bằng

cách tiêm IP vào các ngày 10, 14, 17, 22. Thể tích khối u được theo dõi trong 28 ngày sau cấy ghép khối u.

Việc điều trị chuột nhất được làm giống người mang khối u MC38.ova bằng tổ hợp của kháng thể kháng hPD-1 và kháng thể kháng hLAG-3 kích hoạt sự hoạt hoá tế bào T trong khối u và ngoại vi. Liệu pháp đơn REGN2810 dẫn đến sự ức chế phát triển khối u riêng phần, trong khi liệu pháp đơn mAb1 không thể hiện sự giảm thể tích khối u trung bình so với chuột được điều trị bằng lớp kháng thể đối chứng (Fig.9). Trái lại, tổ hợp của mAb1 (25mg/kg) và REGN2810 (10mg/kg) chứng minh sự ức chế mạnh sự phát triển khối u MC38.Ova. Việc phân tích một đường biến thể (ANOVA) với kết quả sau thử nghiệm nhiều so sánh Bonferroni biểu thị sự khác nhau đáng kể về thể tích khối u trung bình giữa nhóm tổ hợp mAb1 và REGN2810 so với liệu pháp đơn mAb1 ($p<0,01$) hoặc lớp kháng thể đối chứng ($p<0,05$) (Fig.10). Khi liệu pháp kết hợp được so với liệu pháp đơn REGN2810, thể tích khối u trung bình tổng thể trong quá trình thử nghiệm thấp hơn đối với liệu pháp kết hợp nhưng sự khác nhau này không đạt đến ý nghĩa thống kê. Tổ hợp của kháng thể kháng LAG-3 và REGN2810 cũng dẫn đến sự làm tăng đáng kể về sự sống của động vật, cũng như trong toàn bộ thời gian sống ($p<0,01$, như được phân tích bởi thử nghiệm log rank Mantel-Cox). Ở ngày 25, 50% chuột được điều trị bằng liệu pháp kết hợp sống như so với đối chứng và liệu pháp đơn (Fig.11). Dựa vào các kết quả này, việc điều trị kết hợp thể hiện tác dụng kháng khối u phụ thuộc liều cộng hợp so với các liệu pháp đơn tương ứng.

Ví dụ 16: Dược động học của kháng thể kháng LAG-3 ở khỉ cynomolgus

Dược động học (PK) của kháng thể kháng LAG3 mAb1 được đặc trưng sau khi dùng một liều trong tĩnh mạch (IV) 1,0, 5,0, hoặc 15,0mg/kg cho khỉ cái cynomolgus (5 động vật mỗi nhóm liều). Thu gom các mẫu máu để xác định nồng độ mAb1 theo chức năng ở các thời điểm khác nhau từ tất cả các động vật. Nồng độ của mAb1 theo chức năng trong huyết thanh được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Kháng thể kháng mAb1 trong huyết thanh được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch tạo cầu dựa trên hoá phóng xạ điện cực. Các tham số PK được ước tính bằng cách sử dụng phân tích không chia ô (NCA). Hồ sơ nồng độ-thời gian trung bình được đặc trưng bởi pha phân phối ngắn ban đầu, tiếp theo pha loại trừ beta tuyến tính (Fig.12). Không quan sát được pha thanh thải qua trung gian đích trong khoảng thời gian nguyên phóng thích 8 tuần. AUC_{inf} trung bình

làm tăng theo cách tỷ lệ với liều như chứng minh được bởi các trị số AUC_{inf} /liều tương tự chéo qua mức liều thử nghiệm. Phù hợp với phát hiện này, trị số độ thanh thải tổng cơ thể trung bình (CL) tương tự đối với 3 nhóm liều. Ngoài ra, nửa chu kỳ phân rã pha beta ($t_{1/2}$) đối với 3 nhóm liều có thể so sánh được, nằm trong khoảng từ 10,8 đến 11,5 ngày. Dựa vào các kết quả này, các mức tác dụng bất lợi không quan sát được (NOAEL) có thể đã được xác định đến 50mg/kg. Các kết quả này biểu thị rằng mAb1 đã chứng minh động học tuyến tính trong các điều kiện của nghiên cứu này.

Ví dụ 17: Đánh giá độc tính của kháng thể kháng LAG3 ở khỉ cynomolgus

Hồ sơ độc tế bào và động độc in vivo của mAb1 được ước tính trong nghiên cứu độc tế bào phù hợp GLP liều lặp lại 4 tuần ở khỉ cynomolgus giống đực và giống cái. Các khỉ (5 con vật/giới tính/nhóm) được cho dùng 0, 2, 10, hoặc 50mg/kg/tuần mAb1 bằng việc tiêm trong tĩnh mạch. Việc đánh giá độc tính dựa vào tỷ lệ tử vong, tỷ lệ gầy chết, các quan sát lâm sàng, thể trọng, sự tiêu thụ thức ăn, các đánh giá bằng mắt thường, các đánh giá ECG, tốc độ hô hấp, oxy xung, nhiệt độ cơ thể, và các đánh giá huyết áp, và các đánh giá thần kinh. Các tham số bệnh lâm sàng (huyết học, sự kết đông, hoá học lâm sàng, và phân tích nước tiểu) và hiện tượng miễn dịch cũng được đánh giá. Khám nghiệm tử thi, việc đo trọng lượng của cơ quan và các đánh giá mô học được thực hiện. Việc khám nghiệm tử thi đầy đủ được thực hiện khi kết thúc thời gian dùng liều hoặc khi kết thúc thời gian phục hồi 8 tuần. Cân trọng lượng của các cơ quan được chọn và mô được thử nghiệm vĩ mô và vi mô.

mAb1 được dung nạp tốt ở tất cả các mức liều được đánh giá khi được dùng qua việc truyền trong tĩnh mạch hàng tuần cho khỉ cynomolgus. Vì mAb1 được dung nạp tốt và không có sự đổi nào có liên quan đến mAb1 trong tham số bất kỳ trong số các tham số an toàn được đánh giá, các mức tác dụng bất lợi không quan sát được (NOAEL) đối với nghiên cứu này được cho là 50mg/kg/liều, liều cao nhất được dùng trong nghiên cứu này.

Ví dụ 18: Lập bản đồ quyết định kháng nguyên dựa vào sự trao đổi hydro/đoteri (H/D) của kháng thể kháng LAG3 H4sH15482P gắn kết với miền ngoại bào của hLAG3

Các thử nghiệm được thực hiện để xác định các gốc axit amin của miền ngoại bào LAG3 của người (các axit amin Leu23-Leu450 của LAG3 của người, số truy cập UniProt P18627, được tạo ra với thể IgG1 của người ở đầu C ("hLag3.Fc") (R&D

Systems, Minneapolis, MN) (SEQ ID NO: 587) mà kháng thể kháng LAG3 H4sH15482P tương tác. Vì mục đích này, việc lập bản đồ quyết định kháng nguyên trao đổi hydro/đơteri (H/D) với phép đo phổ khối (HDX-MS) được sử dụng. Phần mô tả khái quát về phương pháp HDX được nêu trong tài liệu Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; và Engen và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Quy trình thử nghiệm

Các thử nghiệm HDX-MS được thực hiện trên nền Waters HDX/MS hợp nhất (Waters Corporation, Milford, MA), gồm có hệ thống Leaptac HDX PAL để đánh dấu đơteri, Waters Acquity M-Class (Auxiliary solvent manager) để tiêu hoá mẫu và nạp, Waters Acquity M-Class (μ Binary solvent manager) đối với gradien cột phân tích và phổ kế khối Synapt G2-Si để đo khối lượng peptit peptic.

Dung dịch đánh dấu được tạo ra trong 10mM dung dịch đệm PBS trong D_2O ở pH 7,0. Để đánh dấu đơteri, 3,8 μ L hLAG3.Fc (5pmol/ μ L) hoặc hLAG3.Fc được trộn trước với kháng thể kháng LAG3 H4sH15482P theo tỷ lệ mol 1:1 được ủ với 56,2 μ L dung dịch đánh dấu D_2O trong nhiều thời điểm khác nhau (ví dụ, đối chứng không được đơteri hoá = 0 giây, đánh dấu đơteri: 1 phút và 20 phút). Dập tắt đơteri hóa bằng cách chuyển 50 μ L mẫu vào 50 μ L dung dịch đệm dập tắt được làm mát trước (TCEP 0,2M, guanidin clorua 6M trong dung dịch đệm phosphat 100mM, độ pH=2,5) và ủ hỗn hợp này ở 1,0°C trong 4 phút. Tiếp theo, mẫu dừng được tiêm vào trong Waters HDX Manager để tiêu hoá trực tuyến pepsin/proteaza XIII. Bẫy peptit tiêu hoá trên cột sơ bộ VanGuard ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 $\times$ 5mm (Waters Corporation) ở 0°C và rửa giải vào cột phân tích ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 1,0 $\times$ 50mm để phân tách gradien 9 phút từ 5% đến 40% B (pha động A: 0,1% axit formic trong nước, pha động B: 0,1% axit formic trong axetonitril). Quang phổ kế khối đã được thiết lập ở điện áp hình nón 37V, thời gian quét 0,5 giây, và khoảng khối lượng/điện tích từ 50 đến 1.700 đơn vị Thomson (Th).

Để nhận biết gốc peptit của Lag3 của người mà H4sH15482P tương tác, dữ liệu LC- MS^E từ mẫu không được đơteri hoá được xử lý và được tìm kiếm đối lại cơ sở dữ liệu mà có trình tự đối với LAG3 của người, pepsin, và trình tự ngẫu nhiên hoá bằng cách sử dụng phần mềm Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Các peptit được nhận biết được nhập vào phần mềm DynamX và lọc theo hai tiêu chuẩn: 1) các sản

phẩm tối thiểu trên mỗi axit amin = 0,2, và 2) ngưỡng tệp sao chép = 3. Tiếp theo, phần mềm DynamX là sự hấp thụ đơteri được xác định tự động của mỗi peptit dựa vào thời gian duy trì và độ chính xác khối lượng cao (<10ppm) qua nhiều thời điểm với 3 bản sao mỗi lần.

Kết quả

Bằng cách sử dụng cột pepsin/proteaza XIII trực tuyến được ghép nối với yêu cầu dữ liệu MS^E, tổng số 123 peptit từ LAG3 của người được nhận biết về mặt năng suất với sự vắng mặt hoặc có mặt kháng thể, biểu thị 78,3% trình tự lặp. Bốn Lag-3 peptit có sự hấp thụ đơteri hoá giảm đáng kể (các trị số delta trọng tâm > 0,8 dalton với trị số $p < 0,05$) khi gắn kết với H4sH15482P. Khối lượng peptit ghi được tương ứng với trị số trung bình của khối lượng MH⁺ trọng tâm từ ba bản sao. Các peptit này, tương ứng với axit amin 34 đến 77 của hLAG3.Fc, (SEQ ID NO: 587), có tốc độ đơteri hoá chậm hơn khi gắn kết với H4sH15482P. Các gốc được nhận biết này cũng tương ứng với các gốc 28 đến 71 của LAG3 của người như được xác định bởi mục nhập Uniprot P18627 (LAG3_HUMAN, SEQ ID NO: 588), và như được minh hoạ trong Bảng 18.

Bảng 18: Peptit LAG3 của người với tốc độ đơteri hoá được thay đổi khi gắn kết H4sH15482P

Gốc axit amin nêu trong SEQ ID NO: 588	Đơteri hoá T=1 phút			Đơteri hoá T=20 phút		
	hLAG3.Fc; MH ⁺	hLAG3.Fc + H4sH15482P; MH ⁺	Δ	hLAG3.Fc; MH ⁺	hLAG3.Fc + H4sH15482P; MH ⁺	Δ
28 – 69	4352,30±0,03	4350,14±0,06	-2,15	4352,33±0,20	4351,43±0,12	-0,90
28 – 71	4672,54±0,03	4670,42±0,01	-2,12	4672,69±0,21	4671,57±0,18	-1,13
31 – 52	2198,11±0,10	2196,49±0,01	-1,61	2198,97±0,18	2197,18±0,10	-1,79
32 – 69	3853,07±0,12	3851,37±0,07	-1,69	3853,23±0,07	3852,35±0,14	-0,88

Ví dụ 19: Thử nghiệm lâm sàng của kháng thể kháng LAG3 ở người bệnh mắc các khối u ác tính sớm

Ví dụ này mô tả thử nghiệm lâm sàng để đánh giá độ an toàn, tính dung nạp và

hoạt tính kháng khối u của kháng thể kháng LAG3 dưới dạng liệu pháp đơn và kết hợp với kháng thể kháng PD-1 ở người bệnh mắc khối u ác tính sớm.

Kháng thể kháng LAG3 làm ví dụ được sử dụng cho nghiên cứu này là kháng thể đầy đủ của người mà gắn kết đặc hiệu với LAG3 của người và chứa HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432 và HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 418/426 (còn được gọi là H4sH15482P và dưới đây được gọi là “mAb1”).

Kháng thể kháng PD-1 được sử dụng cho nghiên cứu này là H4H7798N (như được bộc lộ trong tài liệu US20150203579; còn được gọi là REGN2810). REGN2810 (kháng thể kháng hPD-1) gắn kết với ái lực cao với PD-1 của người và phong bế sự tương tác của PD-1 với PD-L1 và PD-L2.

Mục đích nghiên cứu

Mục đích chính của nghiên cứu này là:

Trong giai đoạn làm tăng liều: để đánh giá độ an toàn và dược động học (PK) để xác định liều pha 2 của mAb1 dưới dạng liệu pháp đơn và kết hợp với REGN2810 ở người bệnh mắc khối u ác tính sớm, bao gồm u lympho. Các điểm cuối bao gồm tốc độ liều giới hạn độc tố (DLT), các sự kiện bất lợi (AE) (bao gồm liên quan đến miễn dịch), các sự kiện bất lợi nghiêm trọng (SAE), sự tử vong và các bất thường phòng thí nghiệm (mức độ 3 hoặc cao hơn đối với mỗi Common Terminology Criteria for Adverse Events [CTCAE]), và dược động học.

Trong pha mở rộng liều: để đánh giá hoạt tính kháng khối u sơ bộ của một mình mAb1 và kết hợp với REGN2810 (phân cách theo nhóm) như đo được bởi ORR. Các điểm cuối bao gồm tốc độ đáp ứng tổng thể (ORR) dựa vào tiêu chuẩn đánh giá đáp ứng trong khối u rắn (RECIST) 1.1 (Eisenhauer và cộng sự 2009, Eur. J. Cancer 45: 228-247) (khối u rắn) và tiêu chuẩn Lugano (Cheson và cộng sự 2014, J. Clin. Oncol. 32: 3059-3068) (u lympho).

Mục đích thứ hai là: (a) để đánh giá hoạt tính kháng khối u sơ bộ của mAb1 đơn lẻ và kết hợp với REGN2810 (phân cách theo nhóm) như đo được bởi ORR dựa vào tiêu chuẩn đánh giá đáp ứng liên quan đến miễn dịch trong khối u rắn (irRECIST) (Wolchok và cộng sự 2009, Clin. Cancer Res. 15: 7412-7420; Nishino và cộng sự

2013, Clin. Cancer Res. 19: 3936-3943), đáp ứng tổng thể tốt nhất (BOR), khoảng thời gian đáp ứng (DOR), tốc độ kiểm soát bệnh, và PFS dựa vào RECIST, irRECIST, và tiêu chuẩn Lugano (Cheson và cộng sự 2014, J. Clin. Oncol. 32: 3059-3068); (b) để mô tả đặc điểm hồ sơ an toàn trong mỗi nhóm mở rộng như xác định được trong pha tăng liều; (c) để mô tả đặc điểm PK của mAb1 dưới dạng liệu pháp đơn và mAb1 và REGN2810 khi được dùng kết hợp; và (d) để đánh giá tính sinh miễn dịch như đo được bởi các kháng thể kháng được chất (ADA) đối với mAb1 và REGN2810.

Các mục đích khai thác của nghiên cứu là: (a) để đánh giá thể tích khối u; (b) để khai thác hiệu quả được động học của REGN2810 trong huyết thanh, huyết tương, tế bào đơn nhân của máu ngoại vi (PBMC), và trong các mẫu mô của khối u (bao gồm mô khối u lưu trữ) thu được ở đường cơ sở, trong quá trình điều trị và tại thời gian tiến triển từ người bệnh được điều trị bằng mAb1 dưới dạng liệu pháp đơn hoặc kết hợp với REGN2810; và (c) để đánh giá khả năng tiên lượng và sự tương quan với đáp ứng lâm sàng đối với chất đánh dấu sinh học được đề cập mà có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) lưu thông axit nucleic của khối u; (ii) sự phân phối tập hợp con PBMC và biểu hiện của các phân tử điểm kiểm tra miễn dịch và các chất đánh dấu sinh học được đề cập khác; (iii) sự biểu hiện của ARN khối u; (iv) số lượng và sự phân phối tế bào lympho thâm thấu khối u (tế bào T CD8+, tế bào T CD4+, tế bào điều hòa T, và sự cho phép khối u, các lớp phụ khác như tế bào B, tế bào có nguồn gốc từ tủy, tế bào NK, v.v.); (v) mức độ biểu hiện (ARN và/hoặc protein thông tin) của PD-1, PD-L1, LAG3, và các chất điều biến điểm kiểm tra khác; (vi) các đột biến trong khối u ung thư đã biết và các kháng nguyên mới của khối u tiềm ẩn; và (vii) lượng dư đột biến khối u.

Thiết kế nghiên cứu

Đây là nghiên cứu tăng liều pha 1, trước tiên ở người (FIH), đánh dấu mở, đa tâm về tính tan toàn, khả năng dung nạp, hoạt tính và PK của mAb1 được dùng dưới dạng liệu pháp đơn và kết hợp với REGN2810 ở người bệnh mắc khối u ác tính sớm. Ba mức độ liều của mAb1 (1,0, 3,0 và 10mg/kg) được nghiên cứu dưới dạng liệu pháp đơn và kết hợp với REGN2810 ở liều 3,0mg/kg.

Sau khoảng thời gian sàng lọc đến 28 ngày, người bệnh nhận đến mười bảy chu kỳ điều trị 21 ngày (trong tổng số đến 51 tuần điều trị), tiếp theo khoảng thời gian 24

tuần. Mỗi người bệnh nhận mAb1 (+/- REGN2810) mỗi 21 ngày.

Việc điều trị tiếp tục cho đến khi thời gian điều trị 51 tuần hoàn thành hoặc cho đến khi tiến triển bệnh, độc tế bào không chấp nhận, rút bỏ sự chấp thuận hoặc tiêu chuẩn rút khỏi nghiên cứu được đáp ứng. Việc đánh giá đáp ứng là mỗi 6 tuần trong 24 tuần đầu tiên, tiếp theo mỗi 9 tuần trong 27 tuần tiếp theo, bất chấp thời trễ dùng liều được chất nghiên cứu. Sau khoảng thời gian tối thiểu 24 tuần điều trị (tối thiểu 8 chu kỳ điều trị), người bệnh giảm hoàn toàn được xác nhận (CR) có thể lựa chọn gián đoạn điều trị và tiếp tục với tất cả các đánh giá nghiên cứu liên quan. Tương tự, sau khi hỏi ý kiến bác sĩ, người bệnh mà đã được điều trị trong khoảng thời gian tối thiểu 24 tuần với bệnh ổn định (SD) hoặc đáp ứng riêng phần (PR) mà đã được duy trì trong 3 lần đánh giá khối u liên tiếp có thể chọn gián đoạn điều trị nhưng vẫn tiếp tục với tất cả các đánh giá nghiên cứu phù hợp. Đối với người bệnh mà trải qua đáp ứng và tiến triển tiếp theo, cần phải làm sinh thiết khối u tại thời điểm tiến triển. Người bệnh mà dung nạp 4 liều của liệu pháp đơn mAb1 và người mà có đánh giá khối u ban đầu ít nhất là SD, nhưng người mà sau đó chứng minh bệnh tiến triển (PD), có sự lựa chọn bổ sung REGN2810 3,0mg/kg vào liều cao nhất của mAb1 được dùng an toàn đến điểm đó (nếu đã biết) để nỗ lực “phóng thích” sự đáp ứng bởi gen 2 hoạt hoá tế bào lympho kết hợp (LAG-3) và phong bế sự chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1). Việc đánh giá tính an toàn được thực hiện ở mỗi lần thăm khám dùng được chất nghiên cứu.

Tăng liều

Ba nhóm liệu pháp đơn tăng liều và điều trị kết hợp được lập kế hoạch để được tham gia (1,0, 3,0 và 10mg/kg mAb1 có hoặc không có 3mg/kg REGN2810). Nhóm thứ nhất cần được tham gia tiếp nhận liệu pháp đơn mAb1 ở 1,0mg/kg. Sự tham gia tiếp theo của mỗi nhóm bổ sung có thể được giới hạn bởi số lượng liều giới hạn độc tế bào (DLT) quan sát được trong các nhóm trước. Các nhóm khởi tăng liều (0,3mg/kg mAb1 có hoặc không có 3mg/kg REGN2810) được tham gia, nếu cần.

Quy tắc tăng liều

Sự biến đổi mô hình 3+3 truyền thống (“4+3”) được sử dụng để đánh giá tất cả các mức liều đối với cả hai nhóm liệu pháp đơn mAb1 và mAb1 + REGN2810. Mặc dù cần phải có tối thiểu 3 người bệnh ở mỗi mức liều có thể đánh giá đối với DLT, để tối đa hoá hiệu quả của việc tăng liều pha 1 trong khi duy trì sự an toàn cho người

bệnh, 4 người bệnh được tham gia ở mỗi mức liều trong trường hợp người bệnh gián đoạn trước khi đánh giá được đối với DLT. Thời gian đánh giá DLT là 28 ngày. Khả năng dung nạp của mức liều chỉ đạt được nếu tất cả người bệnh đánh giá được DLT tiền ần hoàn thành thời gian DLT 28 ngày mà không có DLT (0/3 hoặc 0/4). Nếu 3 người bệnh hoàn thành khoảng thời gian DLT mà không trải qua DLT, nhưng có người bệnh thứ tư trong thời gian đánh giá DLT, khả năng dung nạp của mức liều chỉ đạt được khi người bệnh thứ tư hoàn thành thời gian đánh giá DLT hoặc gián đoạn điều trị trước khi đánh giá được đối với DLT. Nếu có 1 DLT trong số 3 hoặc 4 người bệnh đánh giá DLT, thì 4 hoặc 3 người bệnh (lần lượt) được tham gia đối với tổng số 7 người bệnh. Tương tự, 1/6 hoặc 1/7 DLT được cho là dung nạp được. Hai DLT trong số 2 đến 7 người bệnh đánh giá được sẽ vượt quá liều dung nạp tối đa (MTD). Ở mức liều cao nhất được dung nạp, để đánh giá tính an toàn hơn nữa, 3 đến 4 người bệnh khác sẽ được tham gia vào trong tổng số 6 đến 10 người bệnh đánh giá được DLT. Từ 0 đến 1 trong số 6 đến 8, hoặc 2 trong số 9 đến 10 DLT dường như là chấp nhận được. Để đánh giá tính an toàn hơn nữa, 3 người bệnh khác có thể được tham gia ở mức liều bất kỳ khi tùy ý bảo trợ (theo ý kiến của người điều tra).

Nếu 1,0mg/kg mAb1 (mức liều 1; DL1) được cho là an toàn (sau 3 đến 7 người bệnh), sự tham gia sẽ bắt đầu ở 3,0mg/kg mAb1 (DL2). Sự tham gia tiếp theo của 4 người bệnh trong DL2, sự tham gia trong nhóm kết hợp thứ nhất (1,0mg/kg mAb1 + 3,0mg/kg REGN2810; DL3) có thể bắt đầu. Sự làm tăng liều đến 10mg/kg mAb1 (DL4) có thể bắt đầu một lần 3,0mg/kg mAb1 (DL2) dường như là an toàn. Nhóm kết hợp thứ hai (3,0mg/kg mAb1 + 3,0mg/kg REGN2810; DL5) chỉ tham gia sau khi cả DL2 và DL3 dường như an toàn. Nhóm kết hợp thứ ba (10mg/kg mAb1 + 3,0mg/kg REGN2810; DL6) chỉ tham gia sau khi cả DL4 và DL5 dường như an toàn. Nếu nhiều nhóm bắt đầu đồng thời, quyền ưu tiên được đưa ra đối với nhóm số lượng thấp (nghĩa là, DL2 so với DL3 hoặc DL3 so với DL4).

Liều giới hạn độc tính tế bào

Khoảng thời gian quan sát DLT để xác định tính an toàn đối với sự tăng liều hoặc bắt đầu liệu pháp kết hợp mới được xác định là 28 ngày bắt đầu với chu kỳ 1, ngày 1, với mục đích kiểm tra tính ban đầu và khả năng dung nạp của 2 liều được chất nghiên cứu thứ nhất (mAb1 có hoặc không có REGN2810, nếu phù hợp). Để đánh giá được đối với DLT, người bệnh phải tiếp nhận ít nhất 2 liều được chất nghiên cứu thứ

nhất (nghĩa là, ngày 1 và ngày 22) và được kiểm tra trong ít nhất 28 ngày sau lần dùng thứ nhất và ít nhất 7 ngày từ lần dùng thứ hai hoặc trải qua DLT (được xác định dưới đây) trước khi kết thúc thời gian DLT. Thời gian trễ trong khi dùng liều thứ hai của (các) dược chất nghiên cứu quá ngày 35 và/hoặc gián đoạn được chất nghiên cứu được cho là DLT nếu được chất nghiên cứu có liên quan. Do đó, khoảng thời gian quan sát DLT dài hơn đối với người bệnh mà việc dùng liều thứ hai của họ bị trễ và đối với người bệnh trải qua AE mà khoảng thời gian này phải được đánh giá để xác định nếu sự kiện là DLT.

Ngoài không có khả năng dùng liều (do độc tính tế bào của dược chất nghiên cứu) #2 trong giai đoạn cửa sổ, DLT nói chung được xác định là độc tính bất kỳ trong số các độc tính tế bào liên quan đến dược chất nghiên cứu sau:

Không có độc tính máu:

- Loại ≥ 2 viêm màng mạch nhỏ
- Loại bất kỳ ≥ 3 không có độc tính máu (ngoại trừ các bất thường không có ý nghĩa về mặt lâm sàng như sự làm tăng amylaza hoặc lipaza không có triệu chứng)

Độc tính máu:

- Loại 4 giảm bạch cầu trung tính kéo dài > 7 ngày
- Loại 4 giảm tiểu cầu
- Loại 3 giảm tiểu cầu kèm chảy máu
- Loại ≥ 3 giảm bạch cầu trung tính gây sốt hoặc loại ≥ 3 giảm bạch cầu trung tính kèm nhiễm trùng

Cả irAE và không irAE mà đáp ứng việc xác định DLT được cho là các DLT.

Liều dung nạp tối đa

MTD được xác định là mức liều thấp hơn nồng độ mà việc dùng liều được dùng do 2 hoặc nhiều DLT trong số 6 đến 7 người bệnh đánh giá được và sẽ được xác định theo cách riêng biệt đối với liệu pháp đơn và liệu pháp kết hợp. Tuy nhiên, do sự kiện AE đã biết do liệu pháp đơn với REGN2810 và kháng thể PD-1/PD-L1 khác, đối với các nhóm kết hợp cường độ, tần suất và tính mới của độc tính tế bào kết hợp có thể

được dùng để xác định MTD và quyết định bổ sung người bệnh khác ở mức liều. Nếu sự tăng liều không dừng đối với DLT, tin rằng MTD đã không được xác định. 3 người bệnh khác sẽ tham gia vào mỗi nhóm liệu pháp đơn và liệu pháp kết hợp dường như mức liều cao nhất được dung nạp (nghĩa là, 6 đến 10 người bệnh trong mỗi nhóm trong số các nhóm này). Nếu sự tăng liều đối với liệu pháp đơn hoặc liệu pháp kết hợp mAb1 với REGN2810 dừng ở 1,0mg/kg do DLT, nhóm được tham gia ở liều 0,3mg/kg. Nếu sự tăng liều đối với liệu pháp đơn hoặc liệu pháp kết hợp mAb1 được dừng do DLT ở mức liều 3,0 hoặc 10mg/kg, liều mAb1 được giảm đến mức liều thử nghiệm trước đối với người bệnh tham gia mới (lần lượt trong nhóm liệu pháp đơn hoặc liệu pháp kết hợp). Không có người bệnh nào được cho phép bắt đầu liệu pháp kết hợp với liều mAb1 mà không dung nạp được dưới dạng liệu pháp đơn.

Liều khuyến cáo pha 2

RP2D đối với các nhóm mở rộng sẽ không cao hơn so với MTD hoặc liều cao nhất được thử nghiệm và có thể khác nhau đối với các nhóm liệu pháp đơn và liệu pháp kết hợp. Quá trình đơteri hoá của RP2D sẽ được dựa vào tính an toàn và dữ liệu PK.

Người bệnh trong nhóm liệu pháp đơn mà dung nạp 4 liều mAb1 và mà có sự đánh giá khối u ban đầu ít nhất SD, nhưng người mà tiếp theo chứng minh PD, có lựa chọn bổ sung REGN2810 3,0mg/kg vào liều cao nhất của mAb1 được dung nạp an toàn đến điểm đó (nếu đã biết) để nỗ lực “phóng thích” đáp ứng do sự phong bế LAG-3 và PD-1 kết hợp.

Các nhóm mở rộng

Một khi khả năng dung nạp của mAb1 đã được thiết lập riêng hoặc kết hợp với REGN2810, nhiều nhóm mở rộng bằng cách sử dụng liệu pháp đơn hoặc liệu pháp tổ hợp để chọn các chỉ định [bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC), bệnh ung thư thận tế bào sáng (ccRCC), bệnh ung thư vú âm tính bộ ba (TNBC), bệnh ung thư da, và bệnh ung thư mô bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán (DLBCL)] được tham gia để đánh giá tiếp tính an toàn và tìm kiếm bằng chứng sơ bộ về hoạt tính kháng khối u trong các khối u mà ở đó LAG3 đã biết cần được biểu hiện hoặc được biểu hiện quá mức; hoạt tính kháng khối u của mAb1 riêng hoặc kết hợp với REGN2810 có thể xảy ra. Việc tham gia vào nhóm mở rộng bắt đầu sau khi việc tăng liều hoàn thành. 10

nhóm mở rộng bổ sung (Bảng 19) sử dụng mô hình Simon 2 giai đoạn (Simon 1989, Controlled Clinical Trials 10: 1-10) được tham gia sau khi xác nhận RP2D. Người bệnh được gán cho nhóm điều trị đặc hiệu dựa vào kiểu khối u người bệnh, sự có mặt hoặc vắng mặt liệu pháp phối tử 1 kháng PD-1/kháng gây chết tế bào theo chương trình (PD-L1) ưu tiên, sự đánh giá của người điều tra về sự phù hợp của chế độ liệu pháp đối với người bệnh đó và mức khả dụng của người bệnh trong nhóm điều trị được gán. Nếu mức độ an toàn phát triển trong nhóm mở rộng riêng rẽ trong giai đoạn 1 của mô hình Simon 2 giai đoạn, sự tham gia có thể được mặc định. Sau khi thảo luận giữa những người điều tra và Regeneron, sự tham gia có thể được bắt đầu lại ở cùng một liều hoặc liều mAb1 thấp hơn. Mức độ an toàn khởi động mặc định có thể bao gồm các sự kiện an toàn sớm hoặc trễ. Người bệnh được điều trị bằng liệu pháp đơn mAb1 (liều được xác định bởi các phát hiện tăng liều) hoặc tổ hợp của mAb1 và REGN2810 3mg/kg Q3W trong đến 51 tuần. Sự tham gia giai đoạn 2 đối với mỗi nhóm mở rộng chỉ xảy ra nếu số lượng tối thiểu đáp ứng khối u được quan sát ở giai đoạn 1.

Bảng 19: Bảng các nhóm mở rộng

Nhóm mở rộng	Kiểu khối u	Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nguyên thể	Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 trải nghiệm	Điều trị
1	Bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ	X		Tổ hợp của mAb1 và REGN2810
2	Bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ		X	Tổ hợp của mAb1 và REGN2810
3	Bệnh ung thư thận tế bào sáng	X		Tổ hợp của mAb1 và REGN2810

4	Bệnh ung thư thận tế bào sáng		X	Tổ hợp của mAb1 và REGN2810
5	Bệnh ung thư vú âm tính bộ ba	X		Tổ hợp của mAb1 và REGN2810
6	Bệnh ung thư da	X		Tổ hợp của mAb1 và REGN2810
7	Bệnh ung thư da		X	Tổ hợp của mAb1 và REGN2810
8	Bệnh ung thư mô bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán	X		Liệu pháp đơn mAb1
9	Bệnh ung thư mô bạch huyết tế bào B tế bào lớn khuếch tán	X		Tổ hợp của mAb1 và REGN2810
10	Bệnh ung thư mô bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán		X	Tổ hợp của mAb1 và REGN2810

Quần thể nghiên cứu

Trong pha tăng liều: người bệnh mắc khối u ác tính sớm mà không nhận liệu pháp trước với dược chất kháng LAG3 và/hoặc chất ức chế PD-1/PD-L1 và mà không phải là ứng viên cho liệu pháp tiêu chuẩn hoặc đối với người mà không có liệu pháp sẵn có được dự đoán tạo ra lợi ích lâm sàng và người bệnh mắc các khối u ác tính mà không chữa khỏi và không đáp ứng với hoặc thể hiện sự tiến triển khối u thay vì liệu pháp tiêu chuẩn.

Trong các nhóm mở rộng liều: người bệnh mắc các khối u ác tính lựa chọn mà không nhận liệu pháp trước với dược chất kháng LAG-3 và là người mà:

- không nhận liệu pháp trước trước với kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nhưng là

các ứng viên phù hợp để nhận liệu pháp dựa vào kháng thể kháng PD-1 (các nhóm 1, 3, 5, 6, và 9)

hoặc

- đã nhận trước liệu pháp dựa vào kháng thể kháng PD-1/PD-L1 và có đáp ứng mục đích được xác nhận (CR hoặc PR) hoặc SD trong ít nhất 3 tháng đối với liệu pháp kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nhưng tiếp theo được tiến triển đối với liệu pháp đó hoặc SD hoặc PR là đáp ứng tốt nhất với đáp ứng ổn định tiếp theo trong 6 tháng (các nhóm 2, 4, 7, và 10)

hoặc

- không phải là các ứng viên cho liệu pháp tiêu chuẩn hoặc đối với người mà không có liệu pháp sẵn có nào được dự đoán tạo ra lợi ích lâm sàng và phù hợp đối với liệu pháp đơn mAb1 (nhóm 8)

Tiêu chuẩn kết luận: người bệnh phải đáp ứng các tiêu chuẩn sau để có thể thích hợp tham gia vào nghiên cứu:

1. Nam giới và nữ giới ≥ 18 tuổi.
2. Các nhóm tăng liều: người bệnh có chẩn đoán ác tính được xác nhận về mặt tế bào học hoặc mô học (bao gồm u lympho) với sự tiến triển được chứng minh về khối u đối với người mà không có tiêu chuẩn thay thế về sự lựa chọn điều trị chăm sóc, hoặc không có tiêu chuẩn thay thế về sự chăm sóc với khả năng chữa bệnh (nghĩa là, không đáp ứng với hoặc sự tiến triển khối u được phát triển thay vì liệu pháp tiêu chuẩn), ADN không được điều trị trước bằng chất ức chế PD-1/PD-L1. Những người bệnh này không cần phải mắc bệnh đo được trong mỗi tiêu chuẩn RECIST 1.1 hoặc Lugano.
3. Các nhóm mở rộng liều: người bệnh có chẩn đoán được xác nhận về mặt mô học hoặc tế bào học với 1 trong số các khối u sau với bệnh đo được trong mỗi tiêu chuẩn RECIST 1.1 hoặc Lugano đáp ứng các tiêu chuẩn sau:
 - i. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nguyên thể giai đoạn IIIB hoặc IV NSCLC mà không có liệu pháp trước đối với bệnh di căn hoặc với sự tiến triển/tái phát bệnh sau một chế độ chứa platin (nhóm 1)

- ii. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 trải qua giai đoạn IIIB hoặc IV NSCLC với không nhiều hơn 2 liệu pháp trước đối với bệnh di căn (nhóm 2)
- iii. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nguyên thể ccRCC sớm hoặc di căn với thành phần tế bào sáng mà đã nhận 1 đến 2 chế độ trước liệu pháp chống tạo thành mạch (nhóm 3)
- iv. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 bị ccRCC sớm hoặc di căn với thành phần tế bào sáng mà đã nhận 1 đến 2 chế độ trước của liệu pháp chống tạo thành mạch (nhóm 4)
- v. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nguyên thể TNBC di căn (estrogen, progesteron, và thụ thể yếu tố phát triển biểu bì của người 2 âm tính) mà đã nhận 5 đường liệu pháp trước hoặc ít hơn (nhóm 5)
- vi. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nguyên thể bệnh ung thư da sớm hoặc di căn mà đã nhận không nhiều hơn 2 chế độ trước đối với bệnh di căn (nhóm 6)
- vii. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 trải qua bệnh ung thư da sớm hoặc di căn đã nhận không nhiều hơn 2 chế độ trước đối với bệnh di căn (nhóm 7)
- viii. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 nguyên thể DLBCL tái phát/khó chữa mà đã tiến triển sau hoặc không phải là ứng viên cho cấy ghép tế bào gốc tủy rưng (nhóm 8 và 9)
- ix. Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 trải qua DLBCL tái phát/khó chữa mà đã tiến triển sau hoặc không phải là ứng viên cho cấy ghép tế bào gốc tủy rưng (nhóm 10)

Lưu ý: *Kháng thể kháng PD-1/PD-L1 trải nghiệm được xác định do đã dung nạp hoặc đang dung nạp liệu pháp kháng PD-1/PD-L1 (nghĩa là, không gián đoạn do độc tế bào) và đã có đối chứng bệnh với:

- a. CR/PR được xác nhận bằng cách tạo ảnh lặp lại hoặc SD trong ít

nhất 12 tuần từ liều thứ nhất, trước khi tiến triển bệnh. Sự tiến triển bệnh phải dựa vào liệu pháp với kháng thể kháng PD-1/PD-L1 hoặc trong 12 tuần dùng liều sau cùng.

b. SD hoặc PR là đáp ứng tốt nhất với đáp ứng ổn định tiếp theo (không giảm lớn hơn 70% từ đường cơ sở) trong 6 tháng trong khi đối với liệu pháp kháng thể kháng PD-1/PD-L1.

4. Trạng thái thực hiện nhóm ung thư hợp tác đông 0 hoặc 1
5. Triển vòng sống ít nhất 3 tháng
6. Chức năng của cơ quan thích hợp và tủy xương như sau: (a) Hemoglobin $\geq 9,0\text{g/dL}$; (b) Số lượng bạch cầu trung tính tuyệt đối $\geq 1,5 \times 10^9/\text{L}$; (c) Số lượng tiểu cầu $\geq 75 \times 10^9/\text{L}$; (d) Creatinin huyết thanh $\leq 1,5 \times$ giới hạn trên tiêu chuẩn (ULN) hoặc tốc độ thâm nhập tiểu cầu được ước tính $> 50 \text{ mL/phút}/1,73\text{m}^2$; (e) Tổng bilirubin $\leq 1,5 \times$ ULN; (f) Aspartat aminotranseferaza và alanin aminotransferaza (ALT) $\leq 3 \times$ ULN hoặc $\leq 5 \times$ ULN, nếu di căn gan; và/hoặc (g) Phosphataza kiềm $\leq 2,5 \times$ ULN (hoặc $\leq 5,0 \times$ ULN, nếu di căn gan hoặc xương)
7. Ý muốn và khả năng phù hợp với các lần thăm khám lâm sàng và các quy trình có liên quan đến nghiên cứu
8. Có sự chấp thuận bằng văn bản.

Các tiêu chuẩn loại trừ: người bệnh mà đáp ứng tiêu chuẩn bất kỳ trong số các tiêu chuẩn sau sẽ được loại trừ ra khỏi nghiên cứu: 1. Hiện tại nhận điều trị trong nghiên cứu khác hoặc đã tham gia vào nghiên cứu chất điều tra và nhận điều trị hoặc sử dụng thiết bị điều tra trong 4 tuần dùng liều thứ nhất của liệu pháp nghiên cứu hoặc nhận điều trị với liệu pháp hệ thống được cải thiện trong 3 tuần dùng liều thứ nhất của liệu pháp nghiên cứu hoặc đã nhận liệu pháp hệ thống trước bất kỳ trong 5 nửa chu kỳ phân rã của liều thứ nhất của liệu pháp nghiên cứu (bất cứ thời gian nào lâu hơn). Đối với các nhóm mở rộng chỉ có 2, 4, 7, 10 (kháng thể kháng PD-1/PD-L1 thử nghiệm), liệu pháp kháng thể kháng PD-1/PD-L1 ưu tiên không thể được dùng trong 3 tuần dùng liều thứ nhất của liệu pháp nghiên cứu, bất chấp nửa chu kỳ phân rã hoặc trạng thái chấp thuận của dược chất. 2. Điều trị trước bằng phân tử sinh học hoặc phân tử nhỏ nhắm trúng đích LAG-3 bất kỳ 3. Liệu pháp phóng xạ trong 2 tuần trước khi ngẫu

nhiên hoá và không phục hồi từ đường cơ sở từ AE bất kỳ do bức xạ 4. Các nhóm mở rộng chỉ: Khối u ác tính khác mà đang tiến triển hoặc cần phải có điều trị tích cực với ngoại trừ bệnh ung thư da datous không ung thư mà trải qua liệu pháp điều trị tiềm ẩn hoặc bệnh ung thư biểu mô cổ tử cung tại chỗ hoặc khối u khác bất kỳ mà dường như được điều trị một cách có hiệu quả bằng đối chứng cục bộ cuối cùng trong ít nhất 2 năm trước khi tham gia. 5. Các khối u di căn của hệ thần kinh trung ương không điều trị hoặc hoạt động. Người bệnh mắc các khối u di căn của hệ thần kinh trung ương được điều trị trước có thể tham gia với điều kiện chúng ổn định (nghĩa là, không có bằng chứng về sự tiến triển bằng cách tạo ảnh trong ít nhất 6 tuần trước liều thứ nhất của việc điều trị nghiên cứu và các triệu chứng thần kinh bất kỳ đã trở về đường cơ sở) và không có bằng chứng về các khối u di căn của hệ thần kinh trung ương mới hoặc phóng to và người bệnh không cần phải dùng corticosteroid hệ thống bất kỳ để quản lý các khối u di căn của hệ thần kinh trung ương trong 4 tuần trước liều thứ nhất REGN2810. 6. Viêm não, viêm màng não hoặc các tai biến không kiểm soát trong năm trước chấp thuận bằng văn bản 7. Bằng chứng đang xảy ra hoặc gần đây (trong 5 năm) về bệnh tự miễn dịch đáng kể mà cần phải có điều trị bằng việc điều trị ngăn chặn miễn dịch hệ thống, mà có thể cho biết nguy cơ đối với các irAE. Nội dung sau không loại trừ: bệnh bạch tạng, bệnh hen ở trẻ nhỏ mà đã được điều trị, sự giảm hoạt động của tuyến giáp mà chỉ cần thay thế hoóc môn, bệnh đái tháo đường typ 1 hoặc bệnh vẩy nến mà không cần phải điều trị hệ thống. 8. Liệu pháp corticosteroid ($> 10\text{mg}$ prednison/ngày hoặc tương đương) trong 1 tuần trước liều thứ nhất của được chất nghiên cứu. Người bệnh mà cần thời gian steroid ngăn không được loại trừ. 9. Lịch sử đã biết về hoặc bằng chứng bất kỳ của bệnh kẽ phổi hoặc viêm thành phế nang hoạt động, không lây nhiễm (5 năm qua) 10. Sự lây nhiễm không kiểm soát với virus gây suy giảm miễn dịch ở người, nhiễm viêm gan B hoặc viêm gan C; hoặc chẩn đoán suy giảm miễn dịch 11. Sự lây nhiễm tích cực cần phải có liệu pháp hệ thống 12. Tiếp nhận vacxin sống trong 30 ngày bắt đầu dùng thuốc nghiên cứu 13. Quy trình phẫu thuật chính, sinh thiết mở hoặc thương tổn do chấn thương đáng kể trong 4 tuần trước sàng lọc 14. Nhồi máu cơ tim trong 9 tháng trước liều thứ nhất của liệu pháp nghiên cứu 15. Cấy ghép tế bào gốc dị sinh trước 16. Tình trạng bệnh bất kỳ mà theo ý kiến của người điều tra sẽ tham gia vào nghiên cứu không có sự được đề cập tốt nhất của người bệnh 17. Phản ứng quá mức dị ứng hoặc cấp tính góp phần vào điều trị kháng

thể 18. Dự ứng đã biết đối với doxyxycyclin hoặc các thuốc kháng sinh tetracyclin khác
 19. Rối loạn lạm dụng do tâm thần hoặc chất đã biết mà sẽ cản trở với sự tham gia với
 các yêu cầu nghiên cứu 20. Nam giới hoặc nữ giới năng động về giới tính có khả năng
 sinh sản không muốn thực hiện việc tránh thụ thai trong thời gian nghiên cứu. Nữ giới
 mà đang mang thai, đang nuôi con bằng sữa mẹ hoặc muốn nhận thức hoặc nam giới
 có kế hoạch làm cha trong khoảng thời gian nghiên cứu theo dự án (sàng lọc thăm
 khám trong 180 ngày sau liều cuối cùng của dược chất nghiên cứu). 21. Nam giới hoặc
 nữ giới hoạt động giới tính có khả năng sinh sản mà không muốn thực hiện sự tránh
 thụ thai phù hợp trước khi bắt đầu điều đầu tiên, trong thời gian nghiên cứu và trong ít
 nhất 6 tháng sau liều cuối cùng của dược chất nghiên cứu được dùng.

Điều trị nghiên cứu

Liệu pháp đơn: mAb1 được dùng cho người bệnh ngoại trú bằng việc truyền trong tĩnh
 mạch (IV) trong 30 phút mỗi 21 ngày đến 51 tuần ở các liều liệu pháp đơn sau:

- DL1: truyền IV 1,0mg/kg mAb1 trong 30 phút mỗi 21 ngày trong 51 tuần
- DL2: truyền IV 3,0mg/kg mAb1 trong 30 phút mỗi 21 ngày trong 51 tuần
- DL4: truyền IV 10mg/kg mAb1 trong 30 phút mỗi 21 ngày trong 51 tuần
- DL-1m: truyền IV 0,3mg/kg mAb1 trong 30 phút mỗi 21 ngày trong 51 tuần
(nếu cần)

Liệu pháp kết hợp: Đối với liệu pháp kết hợp, trình tự dùng dược chất nghiên cứu là
 mAb1 thứ nhất tiếp theo REGN2810 vào cùng một ngày. Các dược chất nghiên cứu
 được cho dùng ở người bệnh ngoại trú bằng việc truyền trong tĩnh mạch trong 30 phút
 mỗi 21 ngày đến 51 tuần. Các chế độ kết hợp theo kế hoạch cần được gán bao gồm:

- DL3: truyền trong tĩnh mạch 1,0mg/kg mAb1 và 3,0mg/kg REGN2810 trong
30 phút mỗi 21 ngày trong 51 tuần
- DL5: truyền trong tĩnh mạch 3,0mg/kg mAb1 và 3,0mg/kg REGN2810 trong
30 phút mỗi 21 ngày trong 51 tuần
- DL6: truyền trong tĩnh mạch 10,0mg/kg mAb1 và 3,0mg/kg REGN2810 trong
30 phút mỗi 21 ngày trong 51 tuần
- DL-1c: truyền trong tĩnh mạch 0,3mg/kg mAb1 và 3,0mg/kg REGN2810 trong

30 phút mỗi 21 ngày trong 51 tuần (nếu cần)

Các điểm đầu nghiên cứu

Các điểm đầu chính

Trong pha tăng liều: Tỷ lệ của DLT, các sự kiện bất lợi (AE; bao gồm các sự kiện có liên quan đến miễn dịch), các sự kiện bất lợi trầm trọng (SAE), tử vong và các khác thường phòng thí nghiệm (loại 3 hoặc cao hơn trong mỗi Common Terminology Criteria for Adverse Events [CTCAE]), và PK

Trong pha mở rộng liều: Tốc độ đáp ứng đối tượng (ORR) dựa vào RECIST 1.1 (khối u rắn) và các tiêu chuẩn Lugano (u lympho)

Các điểm đầu thứ cấp

ORR dựa vào các tiêu chuẩn đánh giá đáp ứng có liên quan đến miễn dịch trong các khối u rắn (irRECIST); đáp ứng tổng thể tốt nhất (BOR), khoảng thời gian đáp ứng (DOR), tốc độ kiểm soát bệnh và sự sống không tiến triển (PFS) dựa vào RECIST, irRECIST, và tiêu chuẩn Lugano); AE; bao gồm các sự kiện có liên quan đến miễn dịch, SAE, sự tử vong và các khác thường phòng thí nghiệm (loại 3 hoặc cao hơn trong mỗi CTCAE); PK và ADA

Quy trình và đánh giá

Tính an toàn và khả năng dung nạp của một mình mAb1 hoặc kết hợp với REGN2810 được kiểm tra bằng việc đánh giá lâm sàng AE và bằng các lần đo lặp lại để đánh giá lâm sàng bao gồm các tín hiệu sống (nhiệt độ, huyết áp, xung và hô hấp), các thử nghiệm vật lý (đầy đủ và giới hạn), điện tâm đồ 12 đầu (ECG), và đánh giá phòng thí nghiệm bao gồm huyết học tiêu chuẩn, hoá học và phân tích nước tiểu.

Các mẫu máu để xác định mAb1 chức năng và REGN2810 chức năng trong huyết thanh và các mẫu ADA (kháng thể kháng mAb1 hoặc kháng thể kháng REGN2810) được thu gom. Các mẫu huyết thanh và huyết tương được thu gom để phân tích chất đánh dấu sinh học bổ sung. Các chất đánh dấu sinh học được động học suy xét, tiên lượng và chẩn đoán có liên quan đến phơi nhiễm điều trị mAb1 và REGN2810, hoạt tính lâm sàng hoặc bệnh cơ sở được điều tra trong huyết thanh, huyết tương, tế bào đơn nhân của máu ngoại vi (PBMC) và mô khối u. Hoạt tính kháng khối u được đánh giá bởi CT và MRI. Mẫu ADN hệ gen được thu gom từ người bệnh mà đã

chấp thuận nghiên cứu phụ hệ gen được lý tuyết.

Kết quả

Người ta mong đợi rằng việc dùng mAb1 là an toàn và được dung nạp tốt bởi người bệnh mắc các khối u ác tính sớm trong nghiên cứu. Tổ hợp với 3mg/kg REGN2810 được mong đợi dẫn đến sự hồi quy khối u như được đánh giá bởi ORR ở người bệnh mắc khối u rắn như bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, bệnh ung thư da, bệnh ung thư thận tế bào sáng, u lympho tế bào B hoặc bệnh ung thư vú.

Sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả trong bản mô tả này. Thực vậy, dựa vào phần mô tả nêu trên và các hình vẽ kèm theo, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra các cải biến khác nhau của sáng chế ngoài các cải biến được mô tả trong bản mô tả này. Các cải biến như vậy có mục đích nằm trong phạm vi bảo hộ của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Danh mục trình tự

Bản sao chính thức của danh mục trình tự này được nộp đồng thời với bản mô tả dạng điện tử qua EFS-Web dưới dạng danh mục trình tự được định dạng ASCII với tên tệp 2016_10_07_10176WO01_SEQ_LIST_ST25.txt ngày 07 tháng 10 năm 2016, và dung lượng khoảng 240kilobyte. Danh mục trình tự này nằm trong tài liệu được định dạng ASCII là một phần của bản mô tả này và được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với protein của gen 3 hoạt hoá tế bào lympho (LAG3) của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (CDR) (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) có trong trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) nêu trong SEQ ID NO: 418 và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) có trong trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) nêu trong SEQ ID NO: 426.
2. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tương tác với một hoặc nhiều axit amin có trong miền ngoại bào của LAG3 (các axit amin từ 28 đến 71 nêu trong SEQ ID NO: 588), như xác định được bởi sự trao đổi hydro/đoteri.
3. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tương tác với một hoặc nhiều axit amin có trong SEQ ID NO: 589, như xác định được bởi sự trao đổi hydro/đoteri.
4. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tương tác với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (a) axit amin 28 đến 69 nêu trong SEQ ID NO: 588; (b) axit amin 28 đến 71 nêu trong SEQ ID NO: 588; (c) axit amin 31 đến 52 nêu trong SEQ ID NO: 588; và (d) axit amin 32 đến 69 nêu trong SEQ ID NO: 588.
5. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất ít nhất mười axit amin nêu trong SEQ ID NO: 589.
6. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất hai mươi axit amin nêu trong SEQ ID NO: 589.
7. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tương tác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 589.

8. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có một hoặc nhiều đặc tính được chọn từ nhóm gồm có:

(a) gắn kết LAG3 monome của người với hằng số cân bằng phân ly gắn kết (K_D) nhỏ hơn khoảng 1,5nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C;

(b) gắn kết LAG3 monome của người với K_D nhỏ hơn khoảng 2nM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C;

(c) gắn kết LAG3 dime của người với K_D nhỏ hơn khoảng 20pM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C;

(d) gắn kết LAG3 dime của người với K_D nhỏ hơn khoảng 90pM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C;

(e) gắn kết với tế bào biểu hiện hLAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 2nM như đo được trong thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy;

(f) gắn kết với tế bào biểu hiện mLAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,3nM như đo được trong thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy;

(g) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II của người với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 20nM như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào;

(h) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II của chuột nhắt với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 15nM như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào;

(i) phong bế sự gắn kết của hLAG3 với MHC nhóm II lớn hơn 90% như xác định được bởi thử nghiệm kết dính tế bào;

(j) phóng thích sự ức chế hoạt tính tế bào T qua trung gian LAG3 với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,5nM như xác định được trong thử nghiệm thông báo luxiferaza; và

(k) gắn kết với tế bào T CD4+ và CD8+ được hoạt hoá với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1,2nM, như xác định được trong thử nghiệm huỳnh quang.

9. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 418.

10. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 426.

11. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 420-422-424-428-430-432.

12. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 418/426.

13. Kháng thể phân lập theo điểm 12, kháng thể này chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 577.

14. Kháng thể phân lập theo điểm 12, kháng thể này chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 578.

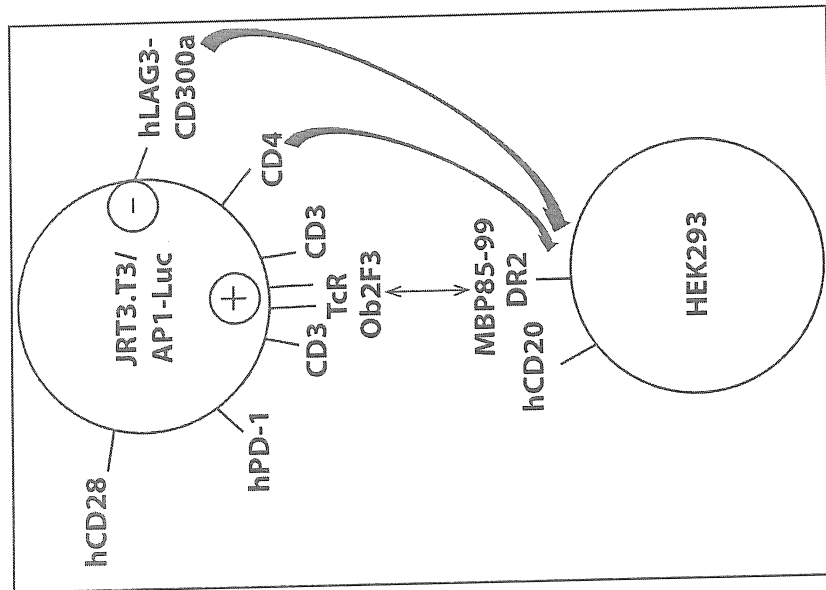
15. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 12, kháng thể này chứa cặp trình tự axit amin chuỗi nặng/chuỗi nhẹ nêu trong các SEQ ID NO: 577/578.

16. Dược phẩm chứa kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

17. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với protein LAG3 của người, trong đó kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có cặp trình tự axit amin chuỗi nặng/chuỗi nhẹ nêu trong các SEQ ID NO: 577/578.

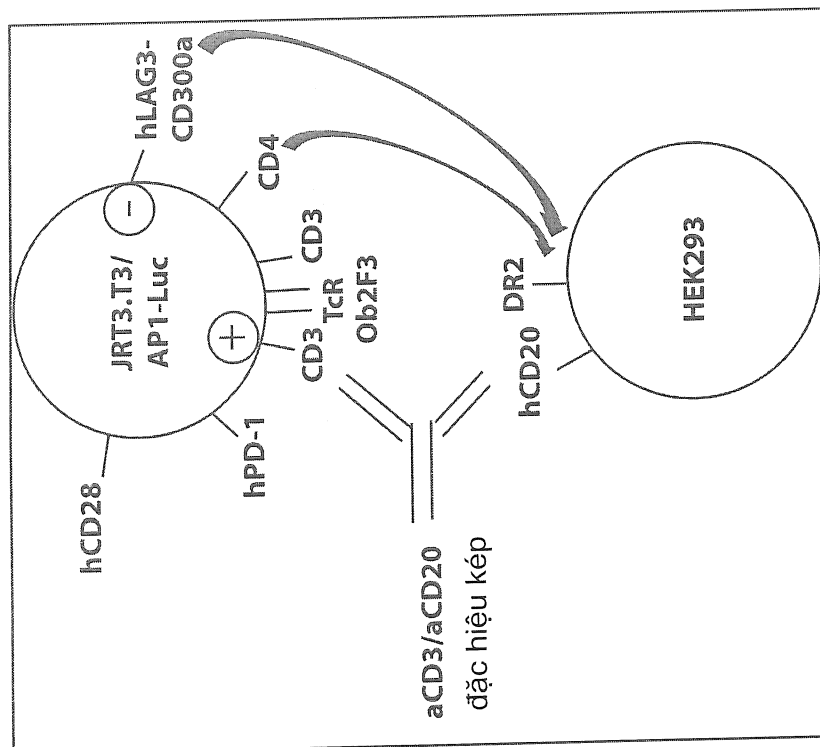
18. Dược phẩm chứa kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 17 và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

1/22



Chế độ "peptide"

Fig.1A



Chế độ "đặc hiệu kép"

Fig.1A

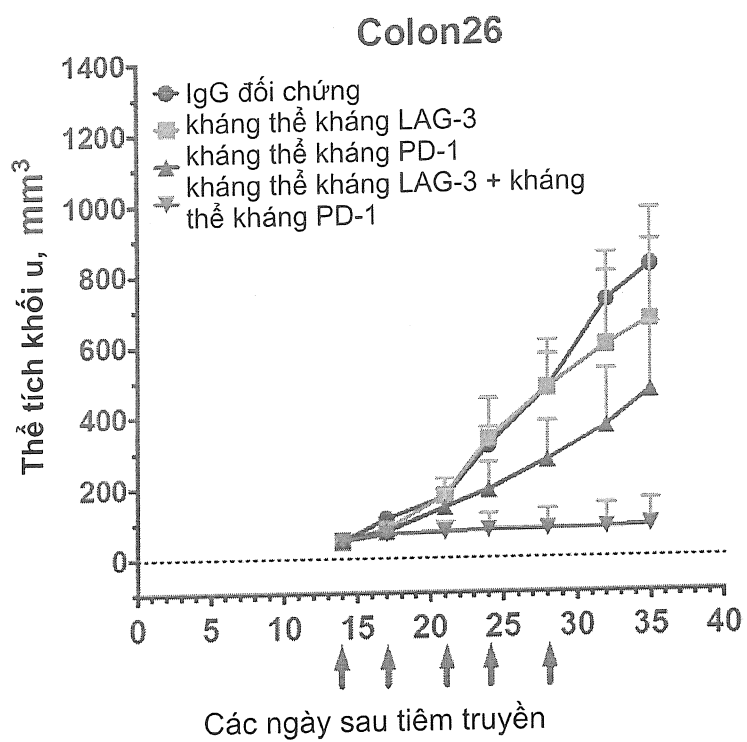


Fig.2A

3/22

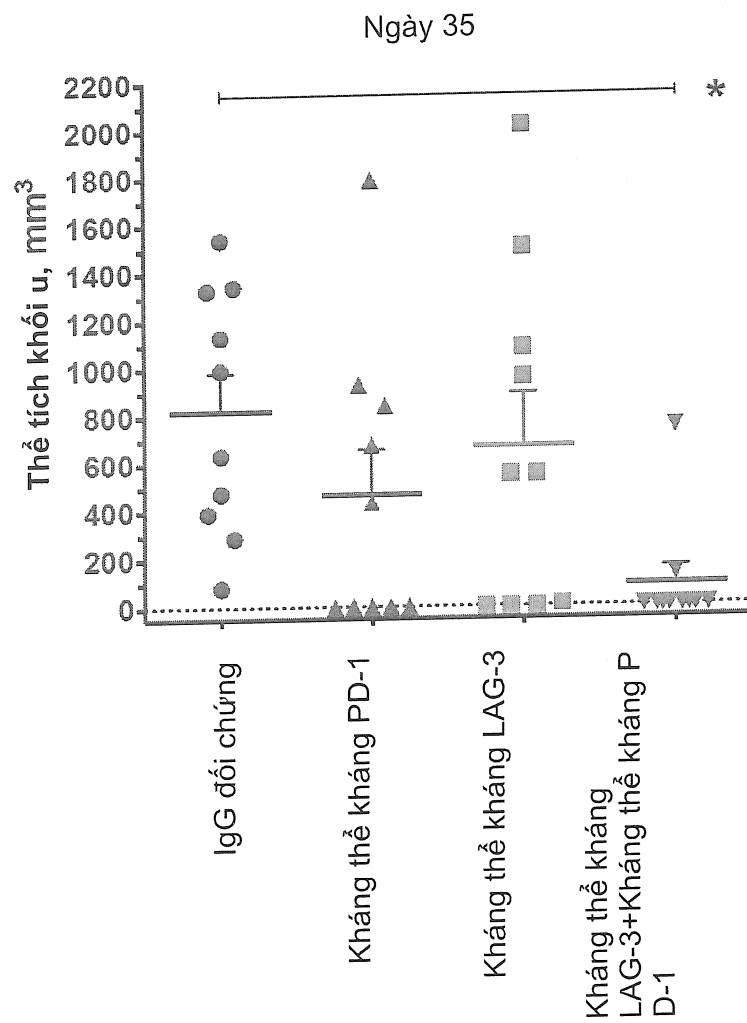


Fig.2B

4/22

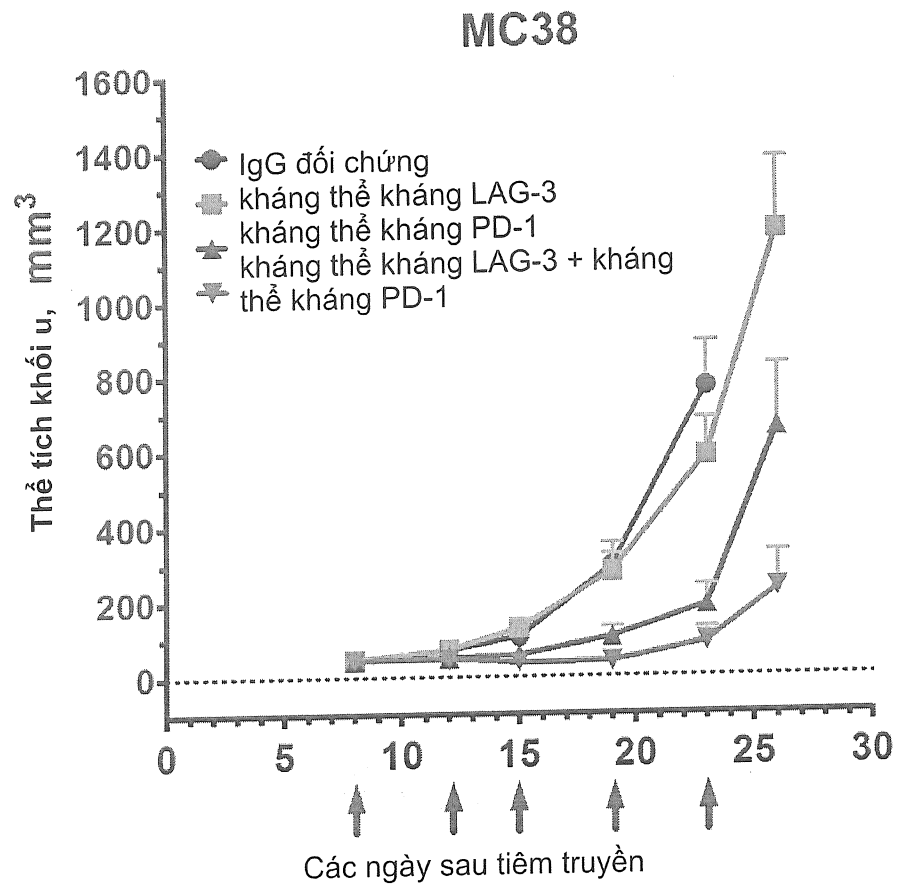


Fig.3A

5/22

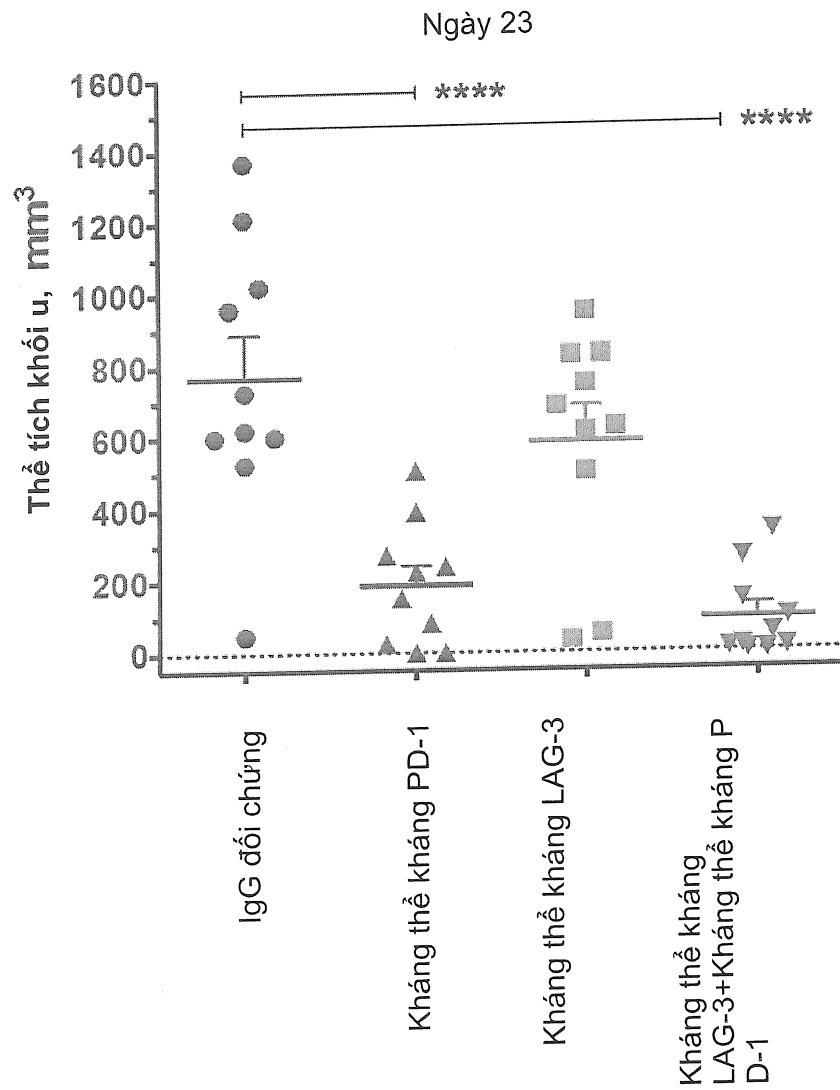
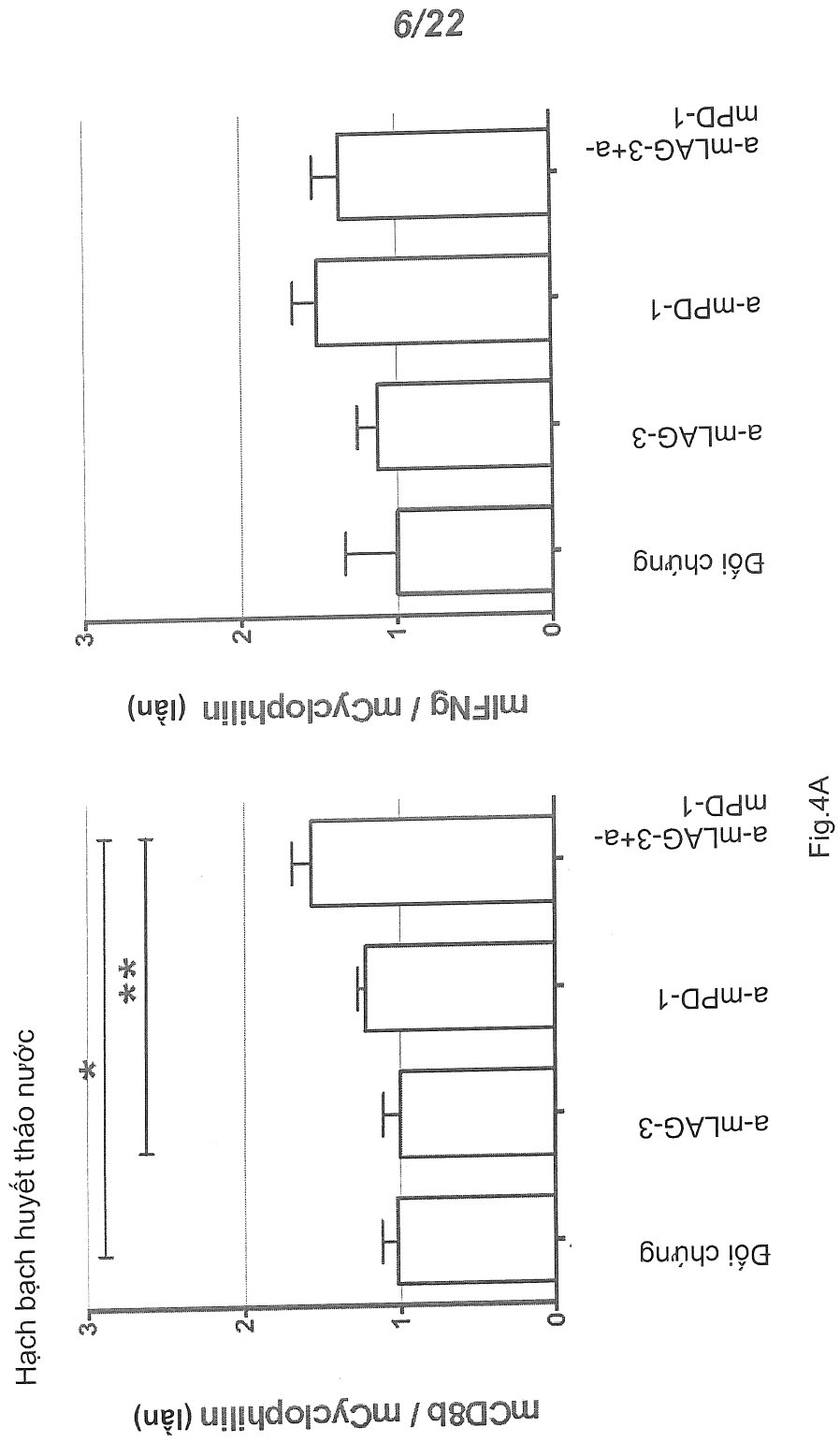
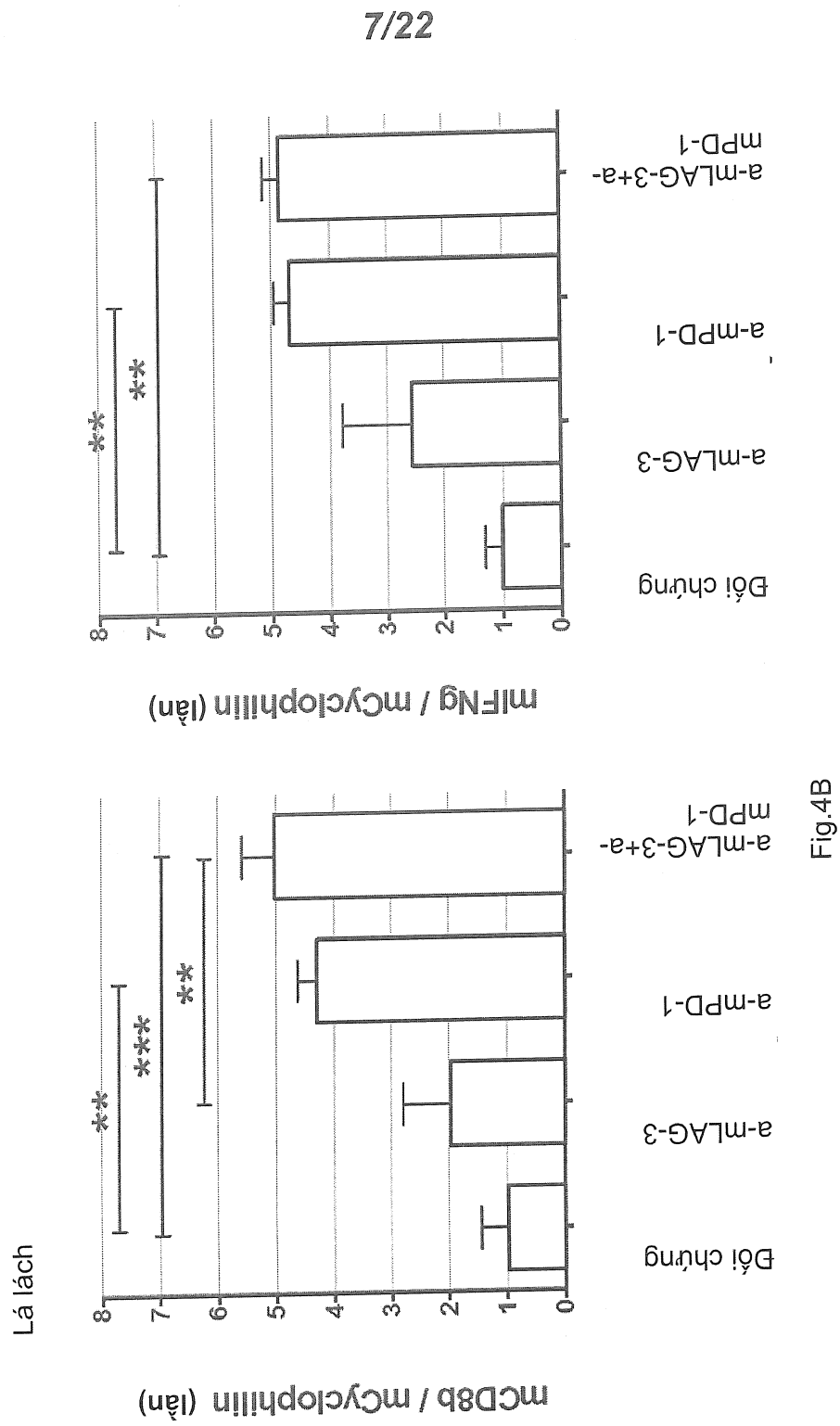


Fig.3B





8/22

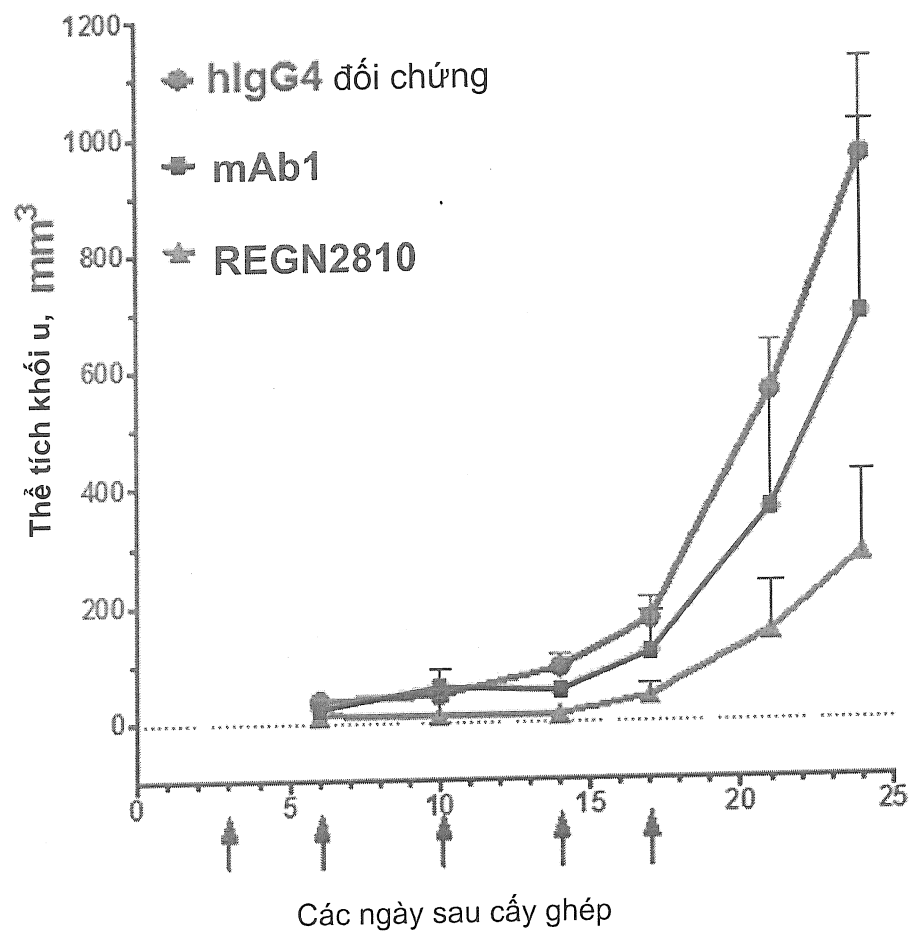


Fig.5A

9/22

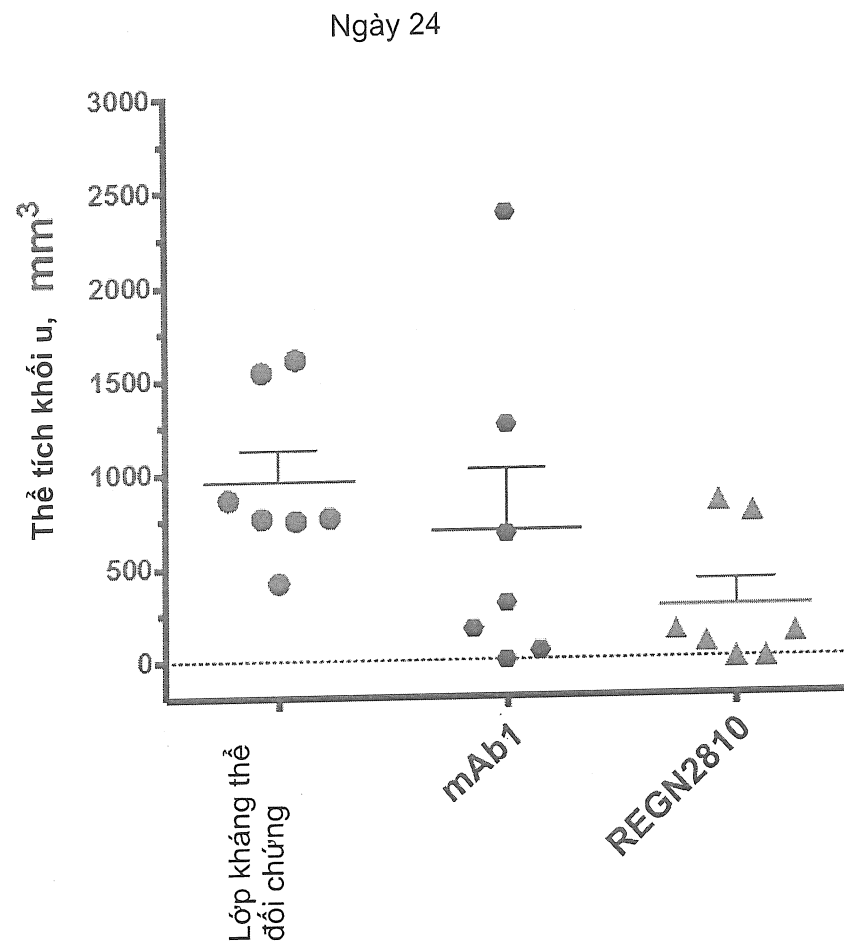


Fig.5B

10/22

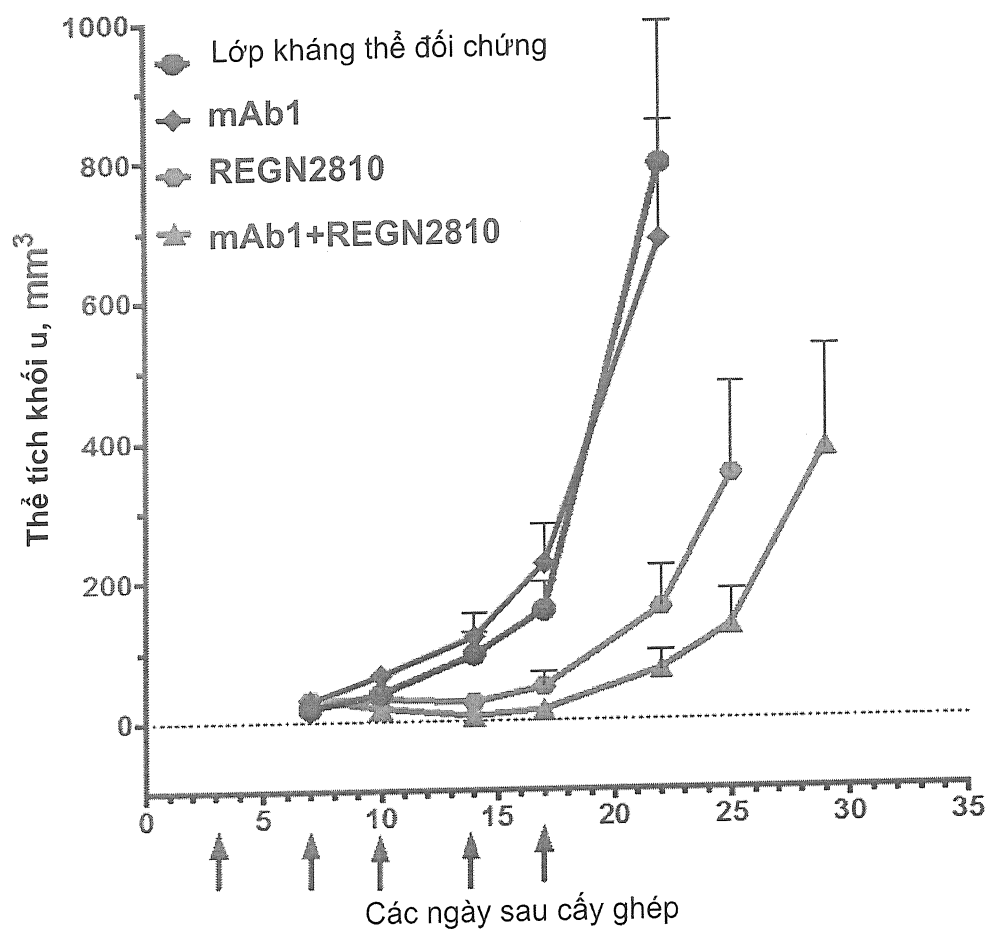


Fig.6A

11/22

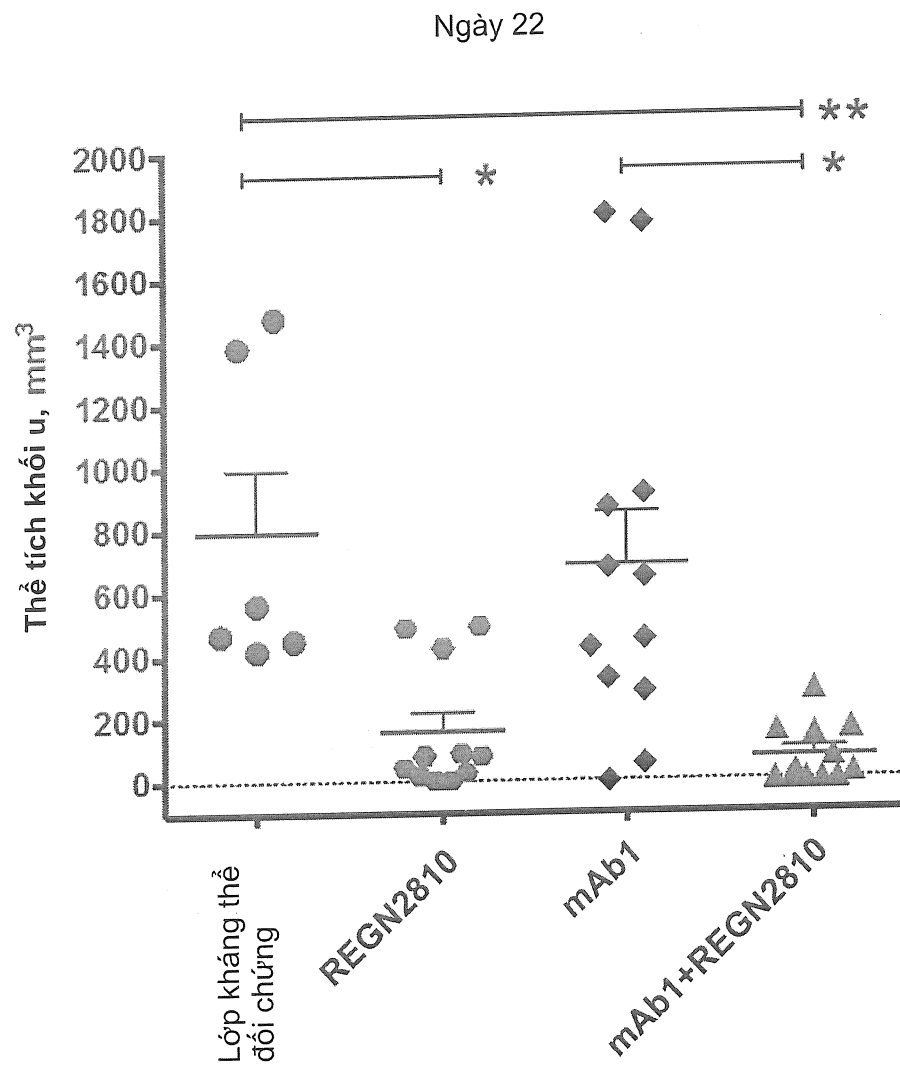


Fig.6B

12/22

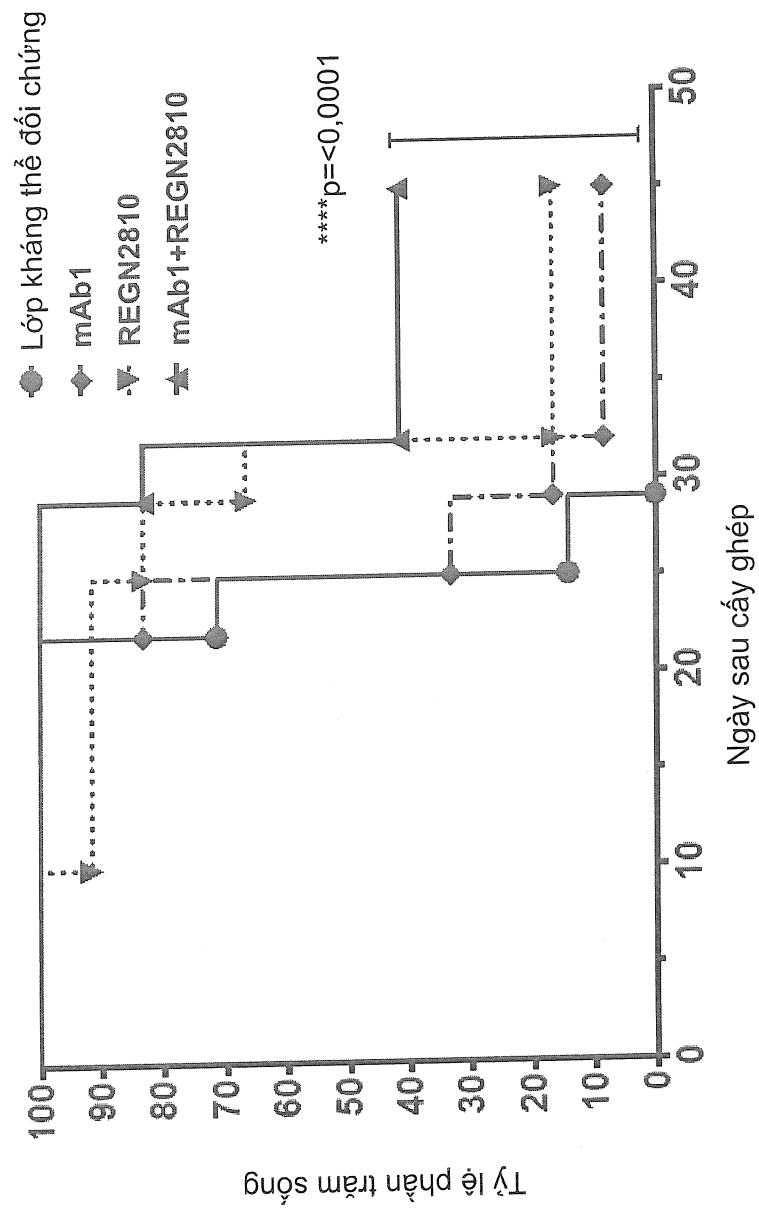


Fig.6C

13/22

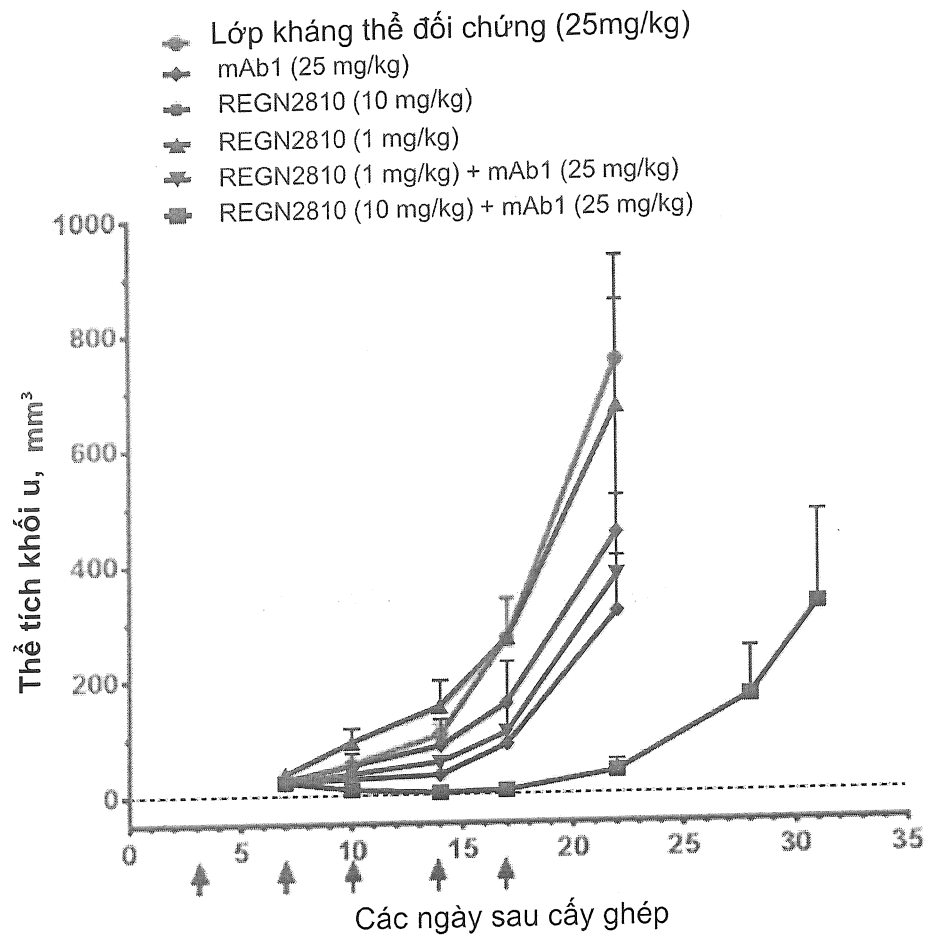


Fig.7A

14/22

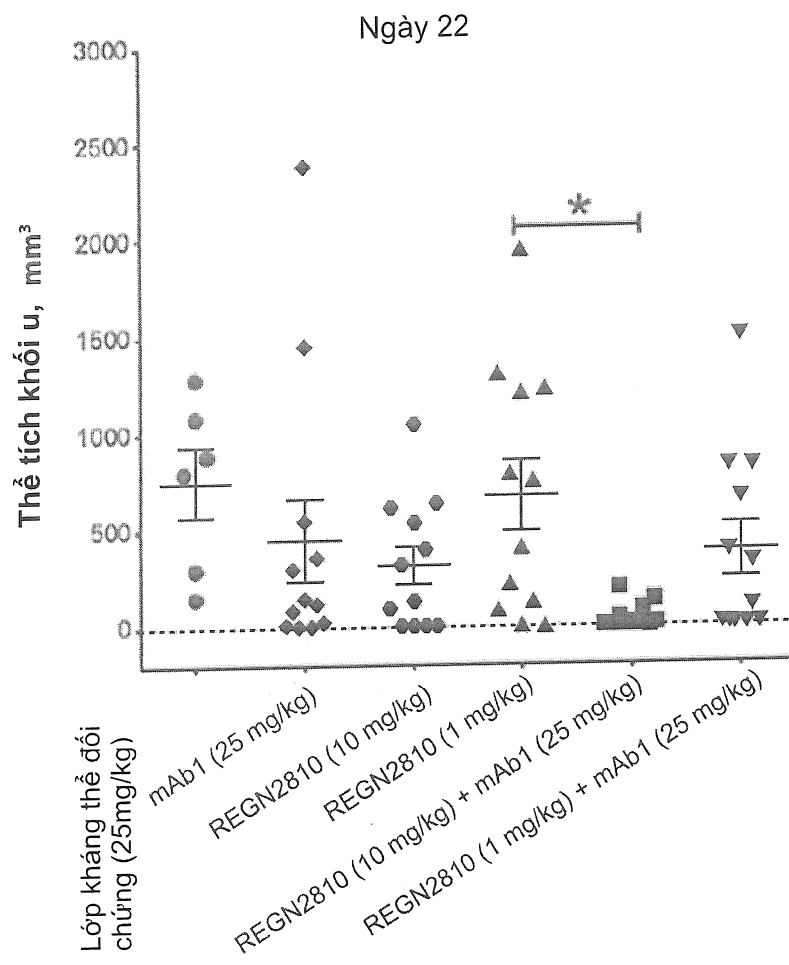


Fig.7A

15/22

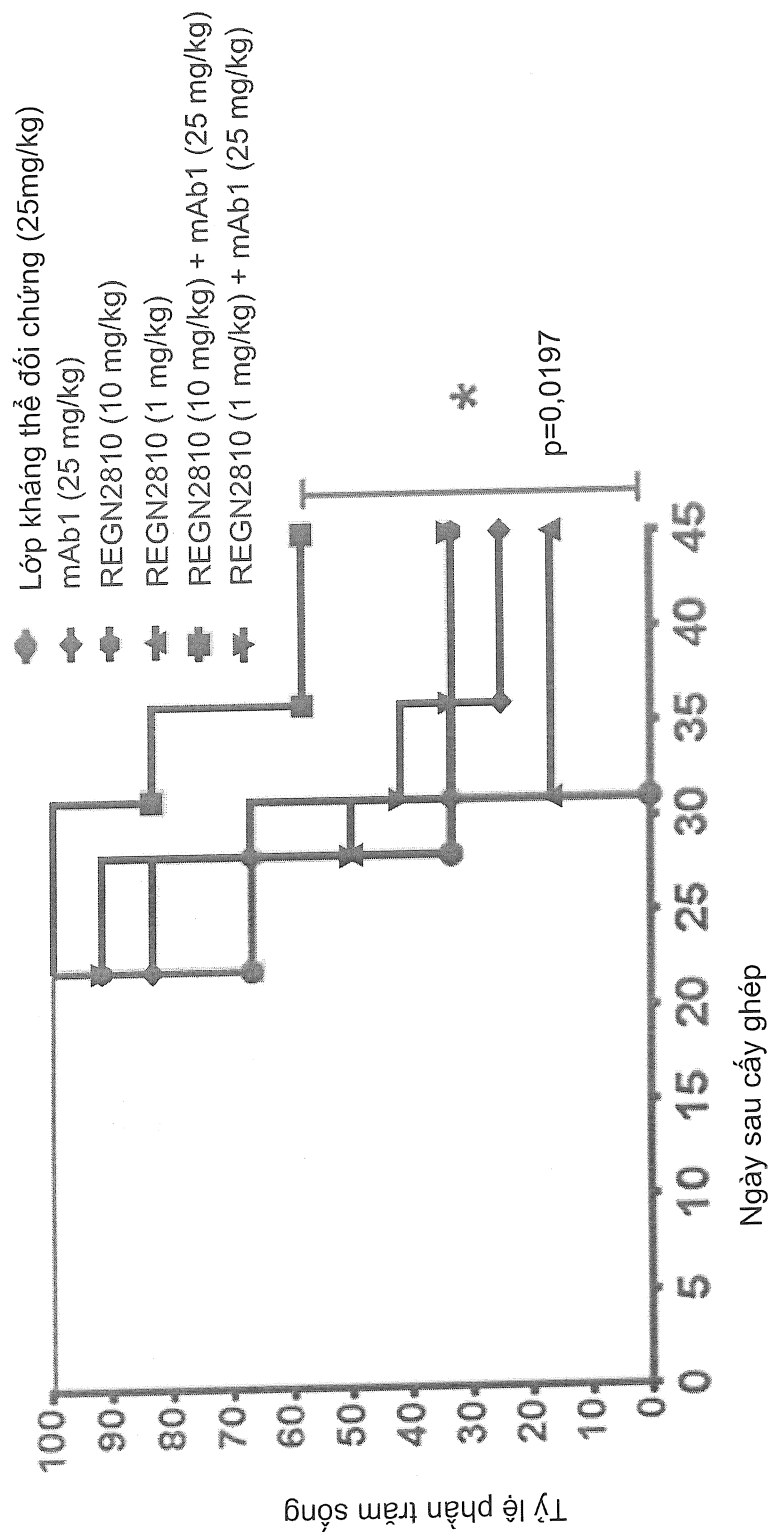


Fig.7C

16/22

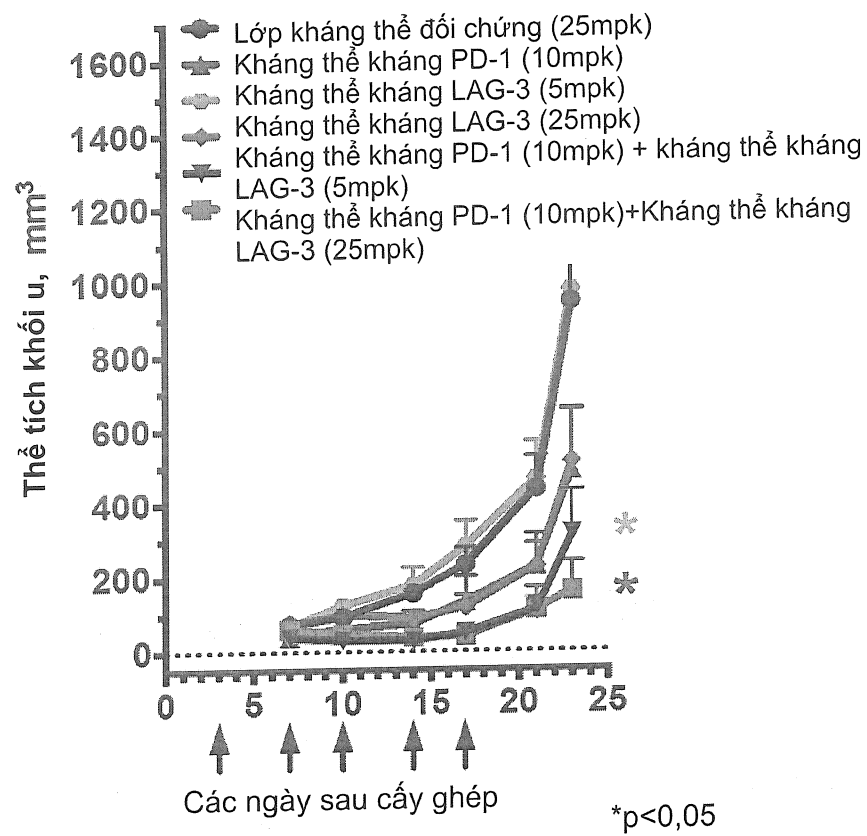
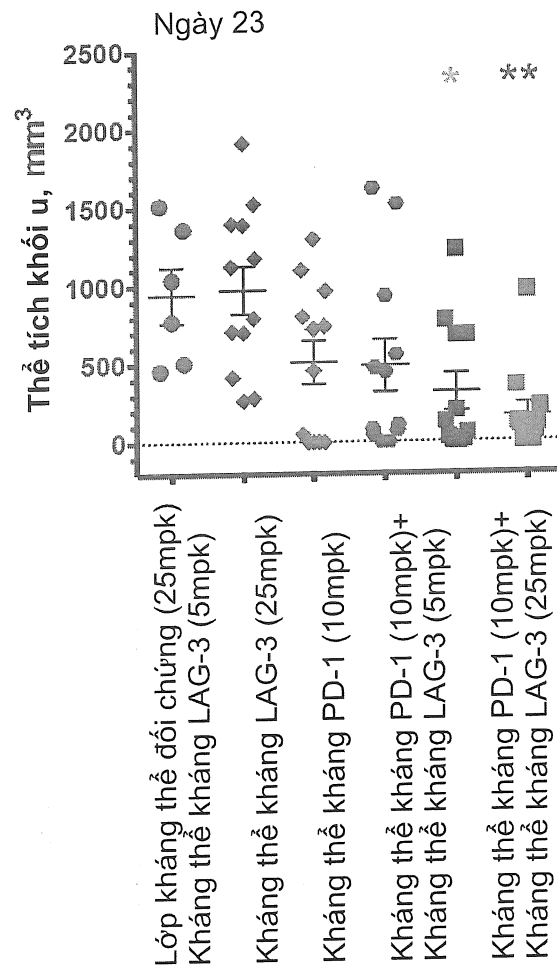


Fig.8A

17/22



**p<0,01, *p<0,05

Fig.8B

18/22

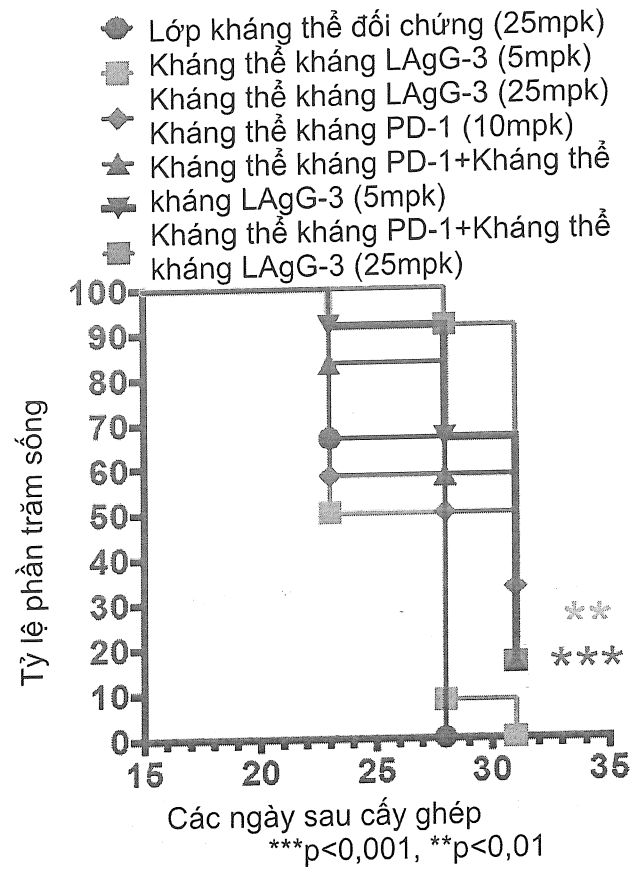


Fig.8C

19/22

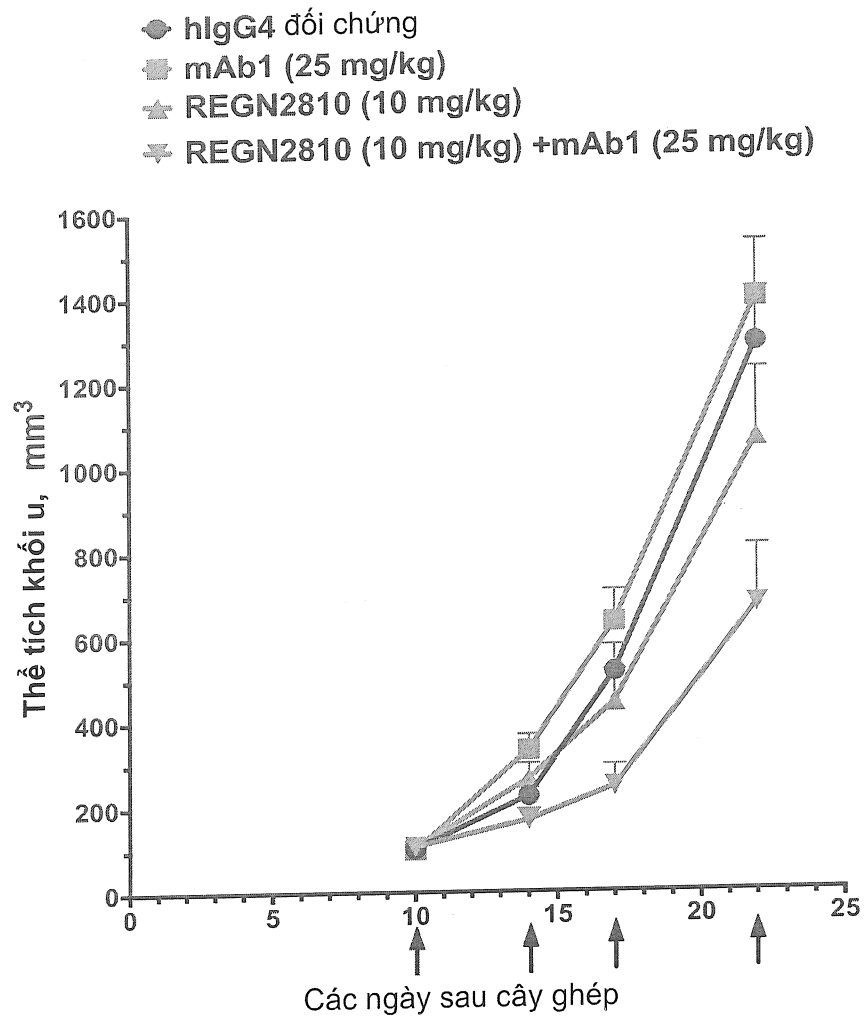


Fig.9

20/22

Day 22

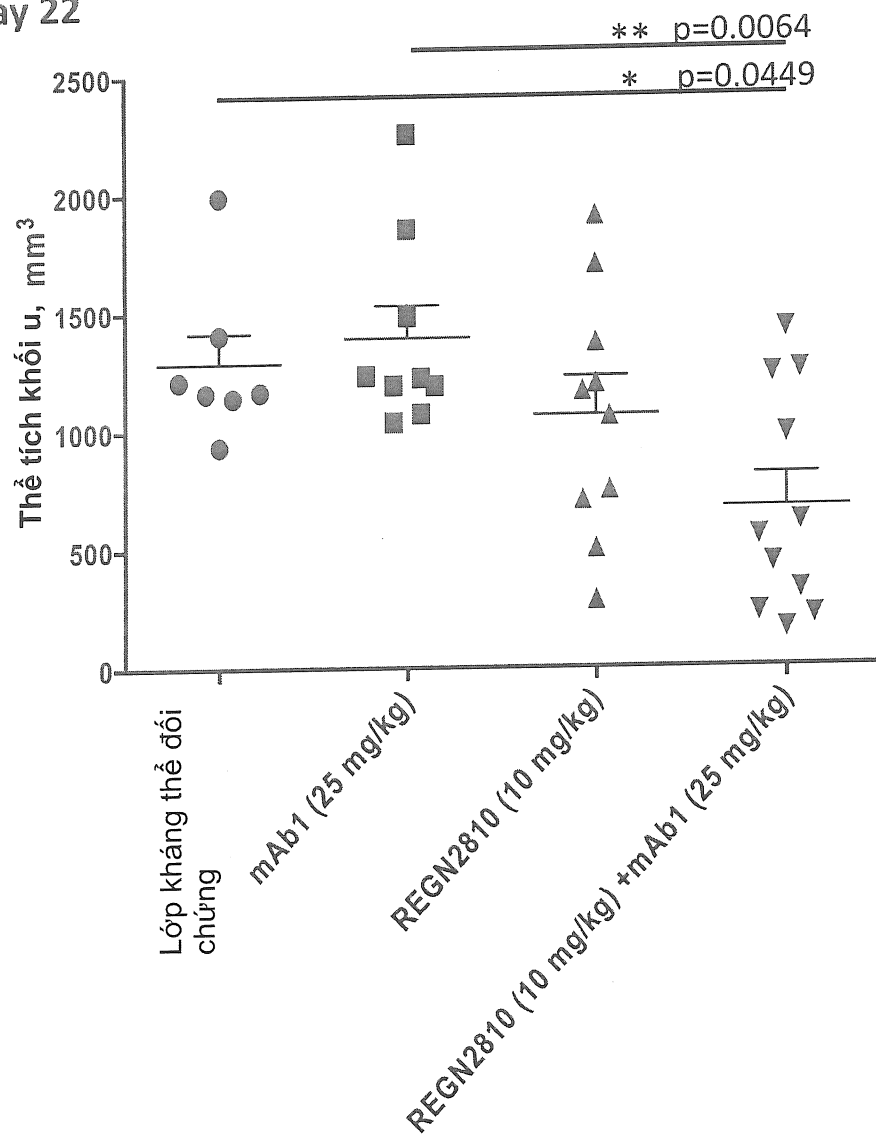


Fig.10

21/22

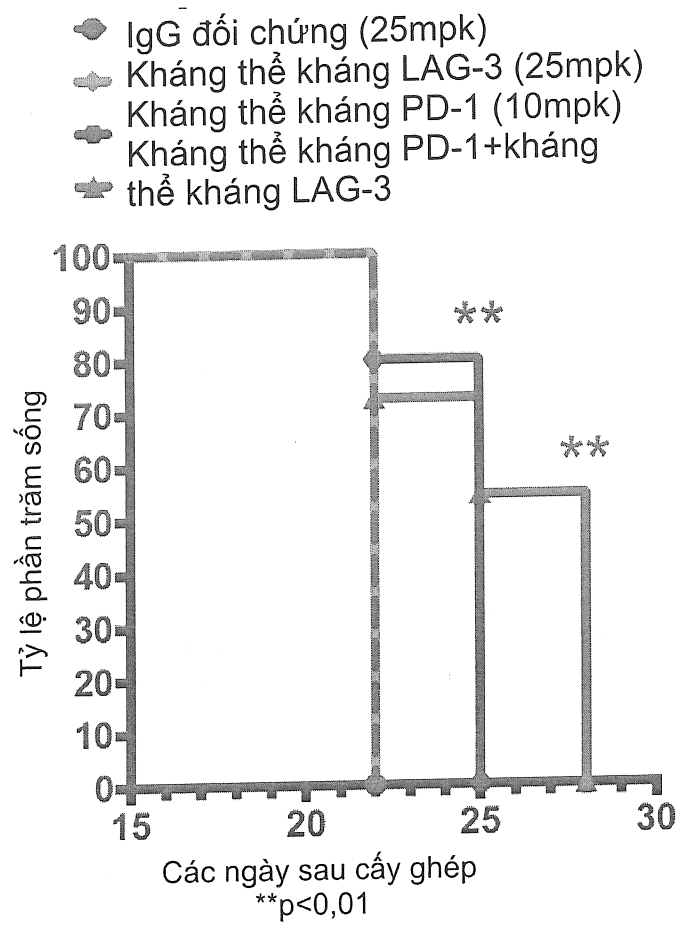


Fig.11

22/22

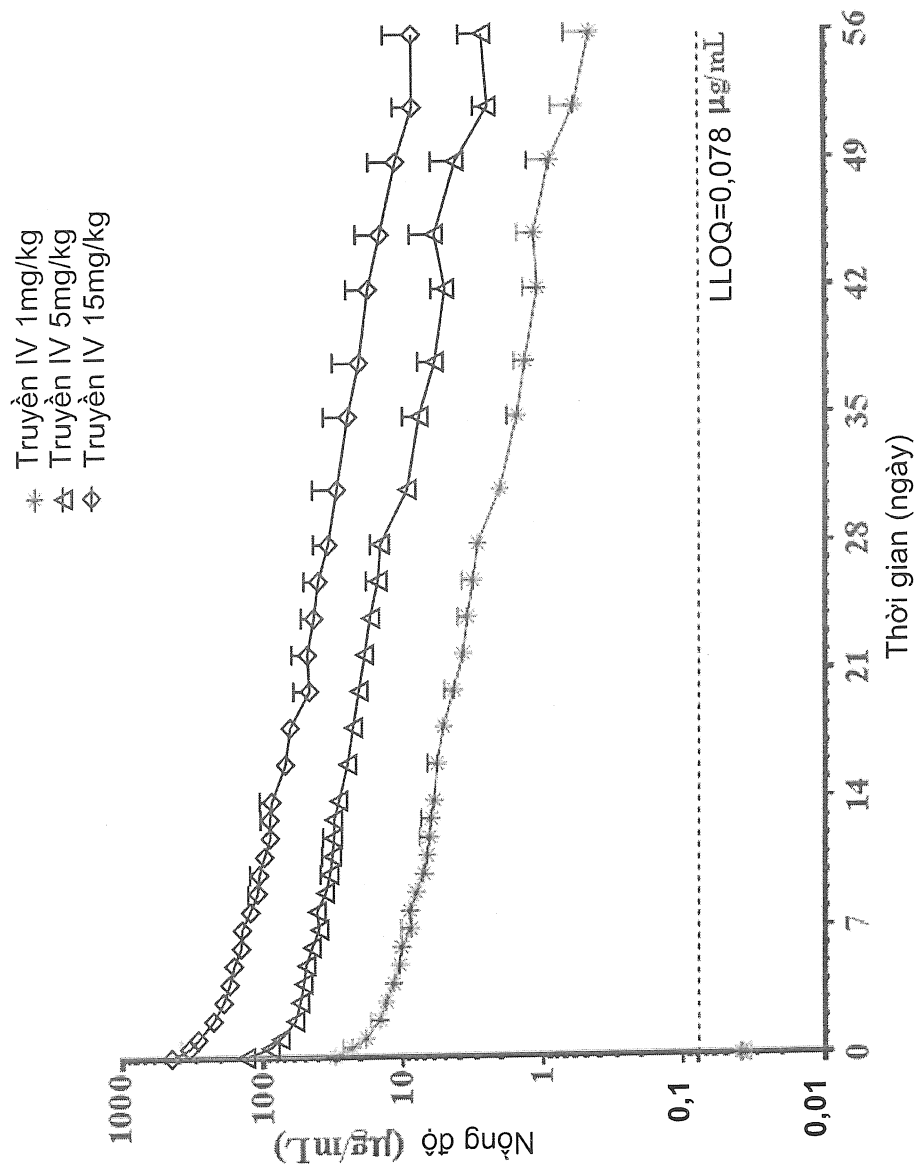


Fig.12

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN CỦA GEN 3 HOẠT HOA TẾ BÀO LYMPHO (LAG3) CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 10176WO01

<150> 62/239,524

<151> 2015-10-09

<150> 62/257,791

<151> 2015-11-20

<150> 62/315,119

<151> 2016-03-30

<150> 62/359,921

<151> 2016-07-08

<150> 62/365,006

<151> 2016-07-21

<160> 589

<170> FastSEQ đối với phiên bản Windows 4.0

<210> 1

<211> 372

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc
60

tcctgtgtgg cctctggatt caccttttagc acctatgcc a tgagttgggt ccgccaggct
120

ccagggatgg ggctggagtg ggtctcaagt attagtggta gtggtcgtaa cacatactat
180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt
240

cttcaaata ga acagcctgag agccgaggac acggccgttt attactgtgc gaaagagtc
300

gtaactggaa cttcgtccta ctactacggt gtggacgtct ggggccaaagg gaccacggtc
360

accgtctcct cg

372

<210> 2

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Arg Asn Thr 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 Lys Glu Ser Val Thr Gly Thr Ser Ser Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 3
 ggattcacct ttagcaccta tgcc
 24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 5

attagtggtta gtggtcgtaa caca
24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 6

Ile Ser Gly Ser Gly Arg Asn Thr
1 5

<210> 7

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 7

gcgaaagagt ccgtaactgg aacttcgtcc tactactacg gtgtggacgt c
51

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 8

Ala Lys Glu Ser Val Thr Gly Thr Ser Ser Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp
1 5 10 15
Val

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 9
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agttatttaa attgggtatca tcagaaacca
120
gggaaagccc caaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaaatgg ggtcccatca
180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240
gaagattttg catcttacta ctgtcaacag agttacagaa ccccgctcac tttcggcgga
300
gggaccaagg tggagatcaa a
321

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 10
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 Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Asn 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 Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 11
cagagcatta gcagttat
18

<210> 12
<211> 6
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 13

gctgcatcc
9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 14

Ala Ala Ser
1

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 15

caacagagtt acagaacccc gctcact
27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 16
 Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 17
 caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt tggtatggca tgcactgggt ccgccaggct
 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatggtatg atggaactaa taaaaagtat
 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca attccaagaa cacggtgtat
 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagattgt
 300
 ggacatagtg gcaacgatcg ggggacttac tattactact acggtatgga cgtctggggc
 360
 caagggacca cggtcaccgt ctctca
 387

<210> 18
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Lys Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Cys Gly His Ser Gly Asn Asp Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 19
 ggattcacct tcagttggta tggc
 24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr Gly
 1 5

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 21
 atatggtatg atggaactaa taaa
 24

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 22
 Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys
 1 5

<210> 23
 <211> 66

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 23
 gcgagagatt gtggacatag tggcaacgat cgggggactt actattacta ctacggtatg
 60
 gacgtc
 66

<210> 24
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 24
 Ala Arg Asp Cys Gly His Ser Gly Asn Asp Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 20

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 25
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc
 300
 caagggacac gactggagat taaa
 324

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 26

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

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 27

cagagcatta gcagctat
18

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 28

Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
1				5	

<210> 29

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 29

gctgcatcc
9

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 30
 Ala Ala Ser
 1

<210> 31
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 31
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc
 30

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 32
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 33
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 33
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggaactggat ccgccagccc
 120
 ccagggaagg ggctggagtg gggtggggaa atcagtcata gaggaaccac caactacaac
 180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca ctggacacgt ccaagaacca gttctccctg
 240
 aaactgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agacgaggaa
 300
 ctggaattcc gtttctttga ctactggggc caggggaacc tggtcaccgt ctctca
 357

<210> 34
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 34
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser His Arg Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 85 90 95
 Arg Asp Glu Glu Leu Glu Phe Arg Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 35
 ggtgggtcct tcagtgggta ctac
 24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 36

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 37
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 37
atcagtcata gaggaaccac c
21

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 38
Ile Ser His Arg Gly Thr Thr
1 5

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 39
tcgagagacg aggaactgga attccgtttc tttgactac
39

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 40
Ser Arg Asp Glu Glu Leu Glu Phe Arg Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 41

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 41
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctatttag cctggtacca acaaaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct cgtctatggg gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
 240
 gaagattttg cattttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 42
 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 Val
 35 40 45
 Tyr Gly 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 Phe Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 43

cagagtgtta gcagctat
18

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 44
Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 45
ggtgcatcc
9

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 46
Gly Ala Ser
1

<210> 47
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 47
cagcagcgta gcaactggcc gctcact
27

<210> 48
<211> 9

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 48
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 49
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcactg tctctggtga ctccatcatc agtaatagtt attactgggg ctggatccgc
 120
 cagccccag ggaaggggct ggagtggatt ggcaatttct tttatactgg ggccacctac
 180
 tacaaccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgctg acacgtccaa gaatcagttc
 240
 tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctc tgtattattg tgcgagttat
 300
 aataggaatt accggttcga cccctggggc caggggaacc tggtcacgt ctcctca
 357

<210> 50
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 51
 ggtgactcca tcatcagtaa tagttattac
 30

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 52
 Gly Asp Ser Ile Ile Ser Asn Ser Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 53
 ttctttttata ctggggccac c
 21

<210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 54
 Phe Phe Tyr Thr Gly Ala Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 55
 gcgagttata ataggaatta ccggttcgac ccc
 33

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 56
 Ala Ser Tyr Asn Arg Asn Tyr Arg Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 57
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 57
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttactt ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc
 300
 caagggacac gactggagat taaa
 324

<210> 58
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 59
 cagagcatta gcagctat
 18

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 60
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 61
 gctgcatcc
 9

<210> 62

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 62
 Ala Ala Ser
 1

<210> 63
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 63
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc
 30

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 64
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 65
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 65
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt acttactact ggagctggat ccgccagccc
 120
 ccagggaagg ggctggagtg gattggagag atcaatcata gtggaaacgc cgactacaac
 180
 ccgtccctca agagtcgagt ctccatatca gtggacacgt ccaagaacca gttctccctg
 240

aggctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctattttatt actgtgcgag agcgggctat
 300
 tgtagtagtc ccacctgcta ttcctactac tacttcggta tggacgtctg gggccaaggg
 360
 accacgggtca cgtctcctc a
 381

<210> 66
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 66
 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Asn Ala Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Gly Tyr Cys Ser Ser Pro Thr Cys Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Phe
 100 105 110
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 67
 ggtgggtcct tcagtactta ctac
 24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 68

Gly Gly Ser Phe Ser Thr Tyr Tyr
1 5

<210> 69
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 69
atcaatcata gtggaaacgc c
21

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 70
Ile Asn His Ser Gly Asn Ala
1 5

<210> 71
<211> 63
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 71
gcgagagcgg gctattgtag tagtcccacc tgctattcct actactactt cggtatggac
60
gtc
63

<210> 72
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 72
Ala Arg Ala Gly Tyr Cys Ser Ser Pro Thr Cys Tyr Ser Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15
Phe Gly Met Asp Val

20

<210> 73
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 73
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagggcacc ctgtctttgt ctctagggga aagagccacc
 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggtttatc agcagcttct tagcctggta ccagcagaaa
 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcttccca
 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatccg cagactggag
 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta actcaccttg gacgttcggc
 300
 caagggacca aggtggagat caaa
 324

<210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 74
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ile Ser Ser
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Phe Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 75
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 75

cagagtgtta tcagcagctt c
21

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 76

Gln Ser Val Ile Ser Ser Phe
1 5

<210> 77

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 77

ggtgcatcc
9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 78

Gly Ala Ser
1

<210> 79

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 79

cagcagtatg gtaactcacc ttggacg
27

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 80
Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 81
<211> 387
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 81
caggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg
60
acctgcaccg tctctggggtt ctactcagc aatgctggga tgggtgtgag ctgggtccgt
120
cagccccctg ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgaatga cgagaagtcc
180
tacagcacat ctctgaggac cagactcacc atctccaagg acacctccaa aagccagggtg
240
gtccttaccg tgaccaactt ggaccctgtg gacacagcca catatttctg tgcacggata
300
ccagagttaa ccagctcgtc gtgggctctc tactacttct acggtatgga cgtctggggc
360
caagggacca cggtcaccgt ctctca
387

<210> 82
<211> 129
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 82
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
20 25 30
Gly Met Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp	Leu	Ala	His	Ile	Phe	Ser	Asn	Asp	Glu	Lys	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser
	50					55					60				
Leu	Arg	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val
65					70					75				80	
Val	Leu	Thr	Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Ile	Pro	Glu	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Phe	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser
		115					120					125			
Ser															

<210> 83
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 83
 ggggttctcac tcagcaatgc tgggatgggt
 30

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 84
 Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala Gly Met Gly
 1 5 10

<210> 85
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 85
 attttttcga atgacgagaa g
 21

<210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 86

Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys
1 5

<210> 87

<211> 63

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 87

gcacggatac cagagtttac cagctcgctcg tgggctctct actacttcta cggatatggac
60
gtc
63

<210> 88

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 88

Ala	Arg	Ile	Pro	Glu	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Phe
1				5					10					15	
Tyr	Gly	Met	Asp	Val											
				20											

<210> 89

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 89

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagcgccacc
60
ctctcctgca gggccagtca gagtattacc agcacctact tcgcctggta ccagcagaaa
120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gctacatcca gcagggccac tggcgtccca
180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggacg gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgatgatt ttgcagtgtg ttactgtcag caatatggta gggtcaccttg gacgttcggc
 300
 caagggacca aggtggaagt caaa
 324

<210> 90
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

<210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 91
 cagagtatta ccagcaccta c
 21

<210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 92
 Gln Ser Ile Thr Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 93
 gctacatcc
 9

<210> 94
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 94
 Ala Thr Ser
 1

<210> 95
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 95
 cagcaatatg gtaggtcacc ttggacg
 27

<210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 96
 Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 97
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 97

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc
 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agttatggta tcagctgggt gcgacaggcc
 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatgataa cacaaactat
 180
 gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accgcagaca catccacgaa tacagcctac
 240
 atggagctaa ggagcctgag atctgacgac acggccattt attactgtgt gcgatggaat
 300
 tgggggttccg tctactggta cttcgatctc tggggccgtg gcaccctggg cactgtctcc
 360
 tca
 363

<210> 98

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 98

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

<210> 99

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 99

ggttacacct ttaccagtta tggc
24

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 100
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 101
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 101
atcagcgctt acaatgataa caca
24

<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 102
Ile Ser Ala Tyr Asn Asp Asn Thr
1 5

<210> 103
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 103
gtgcgatgga attgggggttc cgtctactgg tacttcgata tc
42

<210> 104
<211> 14

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 104
 Val Arg Trp Asn Trp Gly Ser Val Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 105
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 105
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60
 ctctcctgca gggccagtca gattattagc agcagctact ttgcctggta ccagcagaaa
 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcgtcca gcagggccac tggcatccca
 180
 gacaggttca gtggcagtgt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
 240
 cctgaagatt ttgcaatgta tttctgtcag cagtatggta actcaccttg gacgttcggc
 300
 caagggacca aggtggaaat caaa
 324

<210> 106
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 106
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ile Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Val Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 107
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 107
 cagattatta gcagcagcta c
 21

<210> 108
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 108
 Gln Ile Ile Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 109
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 109
 ggtgcgtcc
 9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 110
 Gly Ala Ser
 1

<210> 111
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 111
 cagcagtatg gtaactcacc ttggacg
 27

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 112
 Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 113
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 113
 cagatcacct tgaaggagtc tggctcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg
 60
 acttgacac tctctggggtt ctcaactcaac actcatagag tgggtgtagg ctggatccgg
 120
 cagccccag gaaaggccct ggagtggcct gcactcattt atgggaatga tgtaagaac
 180
 tacagcccat ctctggagac caggctcacc atcgccaagg acacctccaa aaaccagggtg
 240
 gtccttacaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catatttctg ttcgtacata
 300
 acgggggaag gaatgtactg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a
 351

<210> 114
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 114
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln

[illegible]

```
<210> 115
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 115
gggtttctcac tcaacactca tagagtgggt
30
```

```
<210> 116
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 116
Gly Phe Ser Leu Asn Thr His Arg Val Gly
  1                      5                      10
```

```
<210> 117
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ tổng hợp

```
<400> 117
atztatggga atgatgttaa g
21
```

<210> 118

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 118
 Ile Tyr Gly Asn Asp Val Lys
 1 5

<210> 119
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 119
 tcgtacataa cgggggaagg aatgtac
 27

<210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 120
 Ser Tyr Ile Thr Gly Glu Gly Met Tyr
 1 5

<210> 121
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 121
 gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgtccgtca cccttggaca gccggcctcc
 60
 atttcctgta ggtctagtca aaacctcatg tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg
 120
 tttcaccaga ggccaggcca atctccaagg cgtctaattt ataaggtttc taaccgggac
 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc
 240

agcaggggtgg aggctgagga tggtgggggtt tattactgca tgcaaggtac acactgggtac
 300
 acatttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa
 333

<210> 122
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 122
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Met Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe 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 Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 123
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 123
 caaaacctca tgtacagtga tggaaacacc tac
 33

<210> 124
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 124
 Gln Asn Leu Met Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 125
 aaggtttct
 9

<210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 126
 Lys Val Ser
 1

<210> 127
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 127
 atgcaaggta cacactggta caca
 24

<210> 128
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 128
 Met Gln Gly Thr His Trp Tyr Thr
 1 5

<210> 129
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 129

caggtgcagc tgcagcagtg gggcgcagga ctattgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtctttcagt gggtattact ggagctggat ccgccagccc
 120
 ccaggaagg gtctggaatg gattggggaa atcaatcata gaggaaacac caactacaac
 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca ctcgacacgt ccaagaaaca gttctccctg
 240
 aacctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctatgtatt actgtacgag agacgaagaa
 300
 caggaactac gtttccttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctca
 357

<210> 130

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 130

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

<210> 131

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 131

ggtgggtcctt tcagtggtta ttac
 24

<210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 132
 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 133
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 133
 atcaatcata gaggaacac c
 21

<210> 134
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 134
 Ile Asn His Arg Gly Asn Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 135
 acgagagacg aagaacagga actacgtttc cttgactac
 39

<210> 136
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 136

Thr Arg Asp Glu Glu Gln Glu Leu Arg Phe Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 137

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 137

gagattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60
 ctctcctgca gggccagtca ggatatttag acctacttag cctggtacca acagagagct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcttccaaca gggccactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
 240
 gaagattttg cattttatta ctgtcaacag cgcagcaact ggccgctcac tttcggcgga
 300
 gggaccgagg tggagatcaa a
 321

<210> 138

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 138

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 Asp Ile Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly 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 Phe Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 139
caggatatta gcacctac
18

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 140
Gln Asp Ile Ser Thr Tyr
1 5

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 141
gggtgcttcc
9

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 142
Gly Ala Ser
1

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 143
caacagcgca gcaactggcc gctcact
27

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 144
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 145
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 145
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc
60
acctgcgttg tccatggtgg gtccttcagt ggttactact ggaactggat ccgccagccc
120
ccaggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gaggaacac caactacaac
180
ccgtccctca agagtcgagt caccgtatca gaagacacgt ccaagaacca gttctccctg
240
aagctgagct ctttgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgtgag aggagaggat
300
tacgattttt ggagtgatta ttataatgac tactggggcc aggaaccct ggtcaccgtc
360
tcctca
366

<210> 146
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 146
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

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

<210> 147
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 147
ggtgggtcct tcagtgggta ctac
24

```
<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 148
Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1             5
```

```
<210> 149
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 149
atcaatcata gaggaaacac c
21
```

$\langle 210 \rangle$ 150

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 150
 Ile Asn His Arg Gly Asn Thr
 1 5

<210> 151
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 151
 gtgagaggag aggattacga tttttggagt gattattata atgactac
 48

<210> 152
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 152
 Val Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Phe Trp Ser Asp Tyr Tyr Asn Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 153
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 153
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60
 ctctcctgca gggccagtca gactattagc agctacttag cctggcacca acagaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaaa gggccacggg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcaccag cctagagcct
 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 154
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 154
 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 Thr Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Lys 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 Thr 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 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 155
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 155
 cagactatta gcagctac
 18

<210> 156
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 156
 Gln Thr Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 157
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 157
 gatgcatcc
 9

<210> 158
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 158
 Asp Ala Ser
 1

<210> 159
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 159
 cagcagcgta gcaactggcc tctcact
 27

<210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 160
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 161
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 161

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgccgc cttcggagac cctgtccctc
 60
 atctgcgctg tctatgggtgg gtccttcagt gggtactact ggagctggat ccgccagccc
 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gaggaagcac caactacaac
 180
 ccgtccctca agagtcgagc caccatatca gttgacacgt ccaagaacca gttctccctg
 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag aggcgaggat
 300
 tactatgata gtagtggtta ctcgtactac tttgactact ggggccaggg aaccctggtc
 360
 accgtctcct ca
 372

<210> 162

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 162

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

<210> 163

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 163

ggtgggtcct tcagtggtta ctac
24

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 164
Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 165
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 165
atcaatcata gaggaagcac c
21

<210> 166
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 166
Ile Asn His Arg Gly Ser Thr
1 5

<210> 167
<211> 54
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 167
tcgagaggcg aggattacta tgatagtagt ggttactcgt actactttga ctac
54

<210> 168
<211> 18

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 168
 Ser Arg Gly Glu Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Ser Tyr Tyr Phe
 1 5 10 15
 Asp Tyr

<210> 169
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 169
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct
 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 170
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 170
 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 Arg Ser Asn Trp Pro Leu

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 85 90
 100 105

95

<210> 171
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 171
 cagagtgtta gcagctac
 18

<210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 172
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 173
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 173
 gatgcatcc
 9

<210> 174
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 174
 Asp Ala Ser
 1

<210> 175
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 175
 cagcagcgta gcaactggcc gctcact
 27

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 176
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 177
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 177
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaggc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcgctg tctatgggtg gtccttcagt ggttactact ggaattggat ccgccagtcc
 120
 ccagggacgg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gagggaacat caacttcaac
 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gaggacacgt ccaaaaacca attctccctg
 240
 aggctgaact ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggagaggat
 300
 tacgatattt ggagtgggta ttataggag tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc
 360
 tcctca
 366

<210> 178
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 178

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

<210> 179

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 179

ggtgggtcct tcagtggtta ctac
24

<210> 180

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 180

Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr	Tyr	
1				5				

<210> 181

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 181

atcaatcata gagggaacat c
21

<210> 182
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 182
Ile Asn His Arg Gly Asn Ile
1 5

<210> 183
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 183
ggcagaggag aggattacga tatttggagt ggttattata gggagtac
48

<210> 184
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 184
Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Ile Trp Ser Gly Tyr Tyr Arg Glu Tyr
1 5 10 15

<210> 185
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 185
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccact
60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca gcagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaga gggccaactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
 240
 gaagattttg ctgtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcgc tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 186
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 186
 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 Lys 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
 Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 187
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 187
 cagagtgtta gcagctac
 18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 188

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 189
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 189
gatgcatcc
9

<210> 190
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 190
Asp Ala Ser
1

<210> 191
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 191
cagcagcgta gcaactggcc tctcgct
27

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 192
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Ala
1 5

<210> 193

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 193
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcgctg tctatgggtg gtccttcagt gagttctact ggaactggat ccgccagccc
 120
 ccagagaagg gcctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caactacaac
 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacatgt ccaagaacca gttctccctg
 240
 cagctgaact ctgtgaccgt cgcggacacg gctctgtatt actgtgcggt tggctacgat
 300
 ttctcgagtt cttatgagga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctctca
 357

<210> 194
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 194
 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 Glu Phe
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Met Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Val Thr Val Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Asp Phe Arg Ser Ser Tyr Glu Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 195
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 195
 ggtgggtcct tcagtgaagt ctac
 24

<210> 196
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 196
 Gly Gly Ser Phe Ser Glu Phe Tyr
 1 5

<210> 197
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 197
 atcaatcatc gtggaaacac c
 21

<210> 198
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 198
 Ile Asn His Arg Gly Asn Thr
 1 5

<210> 199
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 199
 gcgtttggct acgattttcg gagttcttat gaggacgtc
 39

```
<210> 200
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ tổng hợp

<400> 200
Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Arg Ser Ser Tyr Glu Asp Val
1 5 10

```
<210> 201
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 201
gaaatttgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60
ctctcctgca gggccagtc ggaattagc acctacttag cctggcacca acagaaacct
120
ggccagcctc ccaggctcct catctatggt tcatccaaca gggccactgg catcccagcc
180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga
300
gggaccaagg tggagatcaa a
321
```

```
<210> 202
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 202															
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	Asp	Ile	Ser	Thr	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	His	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35				40						45			
Tyr	Gly	Ser	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

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 85 90
 100 105

95

<210> 203
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 203
 caggatatta gcacctac
 18

<210> 204
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 204
 Gln Asp Ile Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 205
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 205
 gggtcatcc
 9

<210> 206
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 206
 Gly Ser Ser
 1

<210> 207
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 207
 cagcagcgta gcaactggcc tctcact
 27

<210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 208
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 209
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 209
 gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcaga agctatgcca tgagttgggt ccgccaggct
 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtgggtg gtggtggtag gacatactac
 180
 acagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagag catgctgtat
 240
 ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccattt attactgtgc gaaagagagg
 300
 gtaactggaa tagaccacta ctactacggt gtggacgtct ggggcccaagg gaccacggtc
 360
 accgtctcct ca
 372

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 210

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

<210> 211

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 211

ggattcacct tcagaagcta tgcc
24

<210> 212

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 212

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	Tyr	Ala		
1				5					

<210> 213

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 213

attagtggtg gtggtggtag gaca
24

<210> 214
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 214
Ile Ser Gly Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 215
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 215
gcgaaagaga gggtaactgg aatagaccac tactactacg gtgtggacgt c
51

<210> 216
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 216
Ala Lys Glu Arg Val Thr Gly Ile Asp His Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp
1 5 10 15
Val

<210> 217
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 217
gacatccaga tgaccacgctc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagt agctatttaa attggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180
 cggttcagtg gcagtgcatac tggaacagat ttcactctcg ccatcagcag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacacta cccccctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 218
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 218
 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 Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 219
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 219
 cagagcatta gtagctat
 18

<210> 220
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 220
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 221
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 221
gctacatcc
9

<210> 222
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 222
Ala Thr Ser
1

<210> 223
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 223
caacagagtt acactacccc cctcact
27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 224
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 225
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 225
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacaac ctggaggggc cctgagactt
 60
 tcctgtgcag cctctggatt tacattcagc agttatgaaa tgaactgggt ccgccagggt
 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatat atcagtagta gtggtaatac caaagactac
 180
 gcaggctctg tgaagggccg agtcaccatc tccagagaca acgccaagaa cttactgtat
 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgttt atcactgtgc gagagatgga
 300
 gggcattacg atattttgac tggttccatg tcctactact actacgcttt ggacgtctgg
 360
 ggccaaggga ccacgggtcac cgtctcctca
 390

<210> 226
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 226
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Lys Asp Tyr Ala Gly Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Gly His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Ser Met Ser Tyr
 100 105 110
 Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ser
 130

<210> 227

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 227
 ggatttacat tcagcagtta tgaa
 24

<210> 228
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 228
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu
 1 5

<210> 229
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 229
 atcagtagta gtggttaatac caaa
 24

<210> 230
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 230
 Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Lys
 1 5

<210> 231
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 231
gcgagagatg gagggcatta cgatatatttg actgggtcca tgtcctacta ctactacgct
60
ttggacgtc
69

<210> 232
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 232
Ala Arg Asp Gly Gly His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Ser Met Ser Tyr
1 5 10 15
Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp Val
20

<210> 233
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 233
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca
180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct
240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc
300
caagggacac gactggagat taaa
324

<210> 234
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 234
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	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
		35				40						45				
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
65					70					75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro	
				85					90					95		
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105								

```
<210> 235
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 235
cagagcatta gcagctat
18
```

```
<210> 236
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 236
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

```
<210> 237
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 237
gctgcatcc
9

<210>	238
<211>	3
<212>	PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 238

Ala Ala Ser

1

<210> 239

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 239

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 240

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 240

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1

5

10

<210> 241

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 241

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttaaa acctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct

120

ccagggaggg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtagtac ctcatactac

180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attacaagaa gacgctgtct

240

ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccgttt attactgtgc gctggatata

300

atggcaacgg taggaggtct ctttaacaac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc
 360
 tca
 363

<210> 242
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 242
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Tyr Lys Lys Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Leu Asp Ile Met Ala Thr Val Gly Gly Leu Phe Asn Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 243
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 243
 ggattcacct ttaaaaccta tgcc
 24

<210> 244
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 244
 Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr Ala
 1 5

<210> 245
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 245
 attagtggtgta gtggtagtagtac ctca
 24

<210> 246
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 246
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser
 1 5

<210> 247
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 247
 ggcgtggata taatggcaac ggtaggaggt ctctttaaca ac
 42

<210> 248
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 248
 Ala Leu Asp Ile Met Ala Thr Val Gly Gly Leu Phe Asn Asn
 1 5 10

<210> 249
 <211> 324
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 249

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc
300
caagggacca aggtggaaat caaa
324

<210> 250

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 250

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

<210> 251

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 251

cagagtgtta gcagcagcta c
21

<210> 252
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 252
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 253
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 253
 ggtgcatcc
 9

<210> 254
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 254
 Gly Ala Ser
 1

<210> 255
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 255
 cagcagtatg gtagctcacc ttggacg
 27

<210> 256
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 256

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 257

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 257

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc
 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agacatacta tcagctgggt gcgacaggcc
 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac
 180
 gcacacaagt tccagggcag agtcacgatt accacggacg aatccacgag cacagcctac
 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attattgtgc gagagcccct
 300
 tatacccgac aggggtactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac cgtctcctca
 360

<210> 258

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 258

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 259
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 259
ggaggcacct tcagcagaca tact
24

<210> 260
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 260
Gly Gly Thr Phe Ser Arg His Thr
1 5

<210> 261
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 261
atcatcccta tcttttggtac agca
24

<210> 262
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 262
Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
1 5

<210> 263

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 263
 gcgagagccc cttatacccg acaggggtac ttcgatctc
 39

<210> 264
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 264
 Ala Arg Ala Pro Tyr Thr Arg Gln Gly Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 265
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 265
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct
 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctactca tttactgggc atctaccgg
 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaaga ttatagtact
 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa
 339

<210> 266
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 266

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

Lys

<210> 267
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 267
 cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac
 36

<210> 268
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 268
 Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 269
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 269
 tgggcatct
 9

<210> 270
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 270
 Trp Ala Ser
 1

<210> 271
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 271
 cagcaagatt atagtactcc gtggacg
 27

<210> 272
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 272
 Gln Gln Asp Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 273
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 273
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
 60
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc aactactata tacactgggt gcgacaggcc
 120
 cctggacaag ggcttgactg gatgggaatt atcaaccctg gtggtggtaa cacaactac
 180
 gcacagaagt tcctgggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgac cacagtctac
 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccatat attactgtgc gagagaaaaac
 300
 tggaactctt actttgacaa ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca
 354

<210> 274
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 274
 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
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Gly Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Leu Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Thr Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asn Trp Asn Ser Tyr Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 275
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 275
 ggatacacct tcaccaacta ctat
 24

<210> 276
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 276
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr
 1 5

<210> 277
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 277
 atcaaccctg gtggtggtaa caca
 24

<210> 278
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 278
 Ile Asn Pro Gly Gly Gly Asn Thr
 1 5

<210> 279
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 279
 gcgagagaaa actggaactc ttactttgac aac
 33

<210> 280
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 280
 Ala Arg Glu Asn Trp Asn Ser Tyr Phe Asp Asn
 1 5 10

<210> 281
 <211> 339
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 281

```
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa cttcttagct
120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg
180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca ctttattact gtcagcaata ttatggtgct
300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaa
339
```

<210> 282

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 282

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

<210> 283

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 283

cagagtgttt tatacagctc caacaataag aacttc
36

<210> 284
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 284
Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Phe
1 5 10

<210> 285
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 285
tgggcatct
9

<210> 286
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 286
Trp Ala Ser
1

<210> 287
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 287
cagcaatatt atgggtgctcc gtggacg
27

<210> 288
<211> 9

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 288
 Gln Gln Tyr Tyr Gly Ala Pro Trp Thr
 1 5

<210> 289
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 289
 caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc
 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatacta tcaactgggt gcgacaggcc
 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtat agcaaactac
 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accacggacg aatccacgaa cacagcctac
 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccattt attactgtgc gagagcgaga
 300
 tatggttcgg ggagttatga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctcctca
 357

<210> 290
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 290
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Arg Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 291
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 291
 ggaggcacct tcagcagcta tact
 24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 292
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 293
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 293
 atcatcccta tcttttggtat agca
 24

<210> 294
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 294
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala
 1 5

<210> 295
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 295
 gcgagagcga gatatgggttc ggggagttat gactac
 36

<210> 296
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 296
 Ala Arg Ala Arg Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 297
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 297
 gacatcgatga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
 60
 atcaactgca agtccagcca gagtggtttta tacacctcca acaataagaa ctacttagct
 120
 tggataccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccg
 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttataatact
 300
 ccatggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa
 339

<210> 298
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 298
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Thr
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 299
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 299
 cagagtgttt tatacacctc caacaataag aactac
 36

<210> 300
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 300
 Gln Ser Val Leu Tyr Thr Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 301
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 301
 tgggcatct
 9

<210> 302
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 302
 Trp Ala Ser
 1

<210> 303
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 303
 cagcaatatt ataatactcc atggacg
 27

<210> 304
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 304
 Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 305
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 305
 cagatcacct tgaaggagtc tggctcctacg ctgggtgaaac ccacacagac cctcacgctg
 60
 acctgcacct tctctggggt ctcactcagc actaatggag tgggtgtggg ctggatccgt
 120
 cagccccag gaaaggccct ggagtggctt ggaatcattt attggaatga tgataagcgc
 180

tacagcccat ctctgaggag cagactcacc atcaccaagg acacctccaa aaaccaggtg
 240
 gtccttataa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgcacacaga
 300
 ggcctcttcg gaggttggtt cgacccctgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca
 360

<210> 306
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 306
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Asn
 20 25 30
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala His Arg Gly Leu Phe Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 307
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 307
 gggttctcac tcagcactaa tggagtgggt
 30

<210> 308
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 308
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Asn Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 309
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 309
 atttattgga atgatgataa g
 21

<210> 310
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 310
 Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys
 1 5

<210> 311
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 311
 gcacacagag gcctcttcgg aggttggttc gacccc
 36

<210> 312
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 312
 Ala His Arg Gly Leu Phe Gly Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 313
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 313
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc aggtatttaa attggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttactt ctgtcaacag agttacaata ccccgctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 314
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 314
 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 Ser Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 315
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 315
cagagcatta gcaggtat
18

<210> 316
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 316
Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
1 5

<210> 317
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 317
gctgcatcc
9

<210> 318
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 318
Ala Ala Ser
1

<210> 319
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 319
caacagagtt acaatacccc gctcact
27

<210> 320

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 320
 Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 321
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 321
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgcaa tctctggatt caccttttagg agttatgcca tgacctgggt ccgccaggct
 120
 ccaggggaagg cgctggagtg ggtctcagtt attagtggta gcggtggtaa cacatactac
 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccgtc tccagagaca attccaggaa cacgctgtat
 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgttc gaaagttgca
 300
 gcagctaata attactatta cgcttttgac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc
 360
 tcctca
 366

<210> 322
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 322
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ile Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

40226

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ser	Lys	Val	Ala	Ala	Ala	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

```
<210> 323
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 323
ggattcacct ttaggagtta tgcc
24

```
<210> 324
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 324
Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Ala
1 5

```
<210> 325
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 325
attagtggta gcggtggtaa caca
24

```
<210> 326
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 326
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asn Thr

1

5

<210> 327

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 327

tcgaaagttg cagcagctaa taattactat tacgctttgg acgtc
45

<210> 328

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 328

Ser	Lys	Val	Ala	Ala	Ala	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Asp	Val
1					5			10					15	

<210> 329

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 329

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgagga gccggcctcc
60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaagta tttggattgg
120
tacctgcaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttggtttc taatcggggc
180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc
240
agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattattgca tgcaagctct acaaactccg
300
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa
336

<210> 330

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 330

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

<210> 331

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 331

cagagcctcc tgcataagtaa tggatacaag tat
33

<210> 332

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 332

Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Tyr	Lys	Tyr
1				5					10	

<210> 333

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 333

ttggtttct
9

<210> 334
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 334
Leu Val Ser
1

<210> 335
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 335
atgcaagctc tacaaactcc gtacact
27

<210> 336
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 336
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 337
<211> 381
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 337
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60
tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggaatg atggaagtaa taaatactat
 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
 240
 ctccaagtga gcagcctgag agccgatgac acggctgtat attactgtgc gagggaacgga
 300
 gaggtcgaat atagcagctc gaattacaac tactacgggc tggatgtctg gggccaaggg
 360
 accacgggtca ccgtctcctc a
 381

<210> 338
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 338
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 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 Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Glu Val Glu Tyr Ser Ser Ser Asn Tyr Asn Tyr Tyr
 100 105 110
 Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 339
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 339
 ggattcacct tcagtaacta tggc
 24

<210> 340
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 340

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
1 5

<210> 341

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 341

atatggaatg atggaagtaa taaa
24

<210> 342

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 342

Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 343

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 343

gcgagggacg gagaggtcga atatagcagc tcgaattaca actactacgg tctggatgtc
60

<210> 344

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 344

Ala Arg Asp Gly Glu Val Glu Tyr Ser Ser Ser Asn Tyr Asn Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Leu Asp Val
 20

<210> 345
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 345
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60
 atcacttgcc aggcgagtca ggacattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctacgat gcatccaatt tggaacagg ggtcccatca
 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct
 240
 gaagatattg taacatatta ctgtcaacag tatgatgatc tcccgatcac cttcggccaa
 300
 gggacacgac tggagattaa a
 321

<210> 346
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 346
 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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 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 Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 347
 <211> 18

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 347
 caggacatta gcaactat
 18

<210> 348
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 348
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 349
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 349
 gatgcatcc
 9

<210> 350
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 350
 Asp Ala Ser
 1

<210> 351
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 351
caacagtatg atgatctccc gatcacc
27

<210> 352
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 352
Gln Gln Tyr Asp Asp Leu Pro Ile Thr
1 5

<210> 353
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 353
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60
tcctgtgcag cctctggatt ctccctttcat aattttgccca tgaactgggt ccgccagget
120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attactggta gtggtactag cacacactac
180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa aacgctatat
240
ctgcaaata atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgg
300
ggctatgatt atagtgggtc ttactacaac tggttcgacc cctgggggcca gggaaccctg
360
gtcaccgtct cctca
375

<210> 354
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 354
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe His Asn Phe
20 25 30

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

<210> 355
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 355
 ggattctcct ttcataatTT tgcc
 24

<210> 356
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 356
 Gly Phe Ser Phe His Asn Phe Ala
 1 5

<210> 357
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 357
 attactggta gtggtactag caca
 24

<210> 358
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 358

Ile Thr Gly Ser Gly Thr Ser Thr
 1 5

<210> 359

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 359

gcgaaagatc ggggctatga ttatagtggt tcttactaca actgggtcga cccc
 54

<210> 360

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 360

Ala Lys Asp Arg Gly Tyr Asp Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Trp Phe
 1 5 10 15
 Asp Pro

<210> 361

<211> 327

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 361

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagaatcacc
 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagtattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctttgct gcatcaaatt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagtag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccatcctt attcactttc
 300

ggccctggga ccaaagtgga tatcaaa
327

<210> 362
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 362
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Phe Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ser
85 90 95
Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 363
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 363
cagagtatta gcagctat
18

<210> 364
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 364
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 365
<211> 9

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 365
 gctgcatca
 9

<210> 366
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 366
 Ala Ala Ser
 1

<210> 367
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 367
 caacagagtt acagtagcccc atccttatttc act
 33

<210> 368
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 368
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ser Leu Phe Thr
 1 5 10

<210> 369
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 369
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctggaggggtc cctgagactc
60
tcctgtgcag tctctggatt caccttcagt agttacgaga tgaactgggt ccgccagggt
120
ccaggaagg ggctggaatg ggtttcacac attagtagta gtggaagtac catatactac
180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat
240
ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatggg
300
aatatctgga gtggttatta tgccgcctac tacttctacg gtatggacgt ctggggccaa
360
gggaccacgg tcaccgtctc ctca
384

<210> 370
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 370
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser His Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Met 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 Asp Gly Asn Ile Trp Ser Gly Tyr Tyr Ala Ala Tyr Tyr Phe
100 105 110
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 371
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 371
ggattcacct tcagtagtta cgag
24

<210> 372
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 372
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu
 1 5

<210> 373
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 373
 attagtagta gtggaagtac cata
 24

<210> 374
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 374
 Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile
 1 5

<210> 375
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 375
 gcgagagatg ggaatatctg gagtggttat tatgccgcct actacttcta cggtatggac
 60
 gtc
 63

<210> 376
 <211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> tổng hợp

<400> 376

```

<400> 376
Ala Arg Asp Gly Asn Ile Trp Ser Gly Tyr Tyr Ala Ala Tyr Tyr Phe
  1                               10                      15
Tyr Gly Met Asp Val
      20

```

<210> 377

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> tổng hợp

<400> 377

```
<400> 377
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc
60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaaaaccta cttgagttgg
120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagatttc taaccggttc
180
tctgggggtcc cagacagaat cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc
240
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctgt acaatttcct
300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa
336
```

<210> 378

 $\langle 211 \rangle$ 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> tổng hợp

<400> 378

<400> 378															
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro
		35					40					45			
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	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	Met	Gln	Ala

				85					90					95			
Val	Gln	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
			100					105					110				

<210> 379
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 379
 caaagcctcg tacacagtga tggaaaaacc tac
 33

<210> 380
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr							
1				5					10								

<210> 381
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 381
 aagatttct
 9

<210> 382
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 382
 Lys Ile Ser
 1

<210> 383
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 383
 atgcaagctg tacaatttcc tcggacg
 27

<210> 384
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 384
 Met Gln Ala Val Gln Phe Pro Arg Thr
 1 5

<210> 385
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 385
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaacc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcgctg tctatgggtgg ggccttcagt gattactact ggaattggat ccgccagccc
 120
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gcggaagcac caactacaac
 180
 ccgtccctca agagtcgtgt caccatttca gttgacacgt ccaagaacca gttctccctg
 240
 aggatgagct ctgtgaccgc cgcggacgcg gctgtgtatt actgtgagag aggagaggat
 300
 tacgatattt ggaatgggta ttatcaggaa aaatggggcc agggaaccct ggtcaccgtc
 360
 tcctca
 366

<210> 386
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 386

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

<210> 387

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 387

gggtggggcct tcagtgatta ctac
24

<210> 388

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 388

Gly	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr	
1				5				

<210> 389

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 389

atcaatcatc gcggaagcac c
21

<210> 390
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 390
Ile Asn His Arg Gly Ser Thr
1 5

<210> 391
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 391
gcgagaggag aggattacga tatttggaat gggtattatc aggaaaaa
48

<210> 392
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 392
Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Ile Trp Asn Gly Tyr Tyr Gln Glu Lys
1 5 10 15

<210> 393
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 393
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60
ctctcctgca gggccagtca gagtatttag acctacttag cctggtacca acagaagcct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaga gggccactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactotca ccatcagcag cctagagcct
 240
 gaagattttg tagtttatta ctgtcaccag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 394
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 394
 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 Thr 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 Lys 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 Val Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 395
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 395
 cagagtatta gcacctac
 18

<210> 396
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 396

Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
1 5

<210> 397
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 397
gatgcatcc
9

<210> 398
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 398
Asp Ala Ser
1

<210> 399
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 399
caccagcgta gcaactggcc tctcact
27

<210> 400
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 400
His Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 401

<211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 401
 caggtgcagc tgcaggagtc ggggccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcactg tctctgggtgg ttccttcagt agttactact ggagttggct ccggcagccc
 120
 ccaggaaagg ggctggagtg gattggatat atcttttaca gtgggagtac cgactacaac
 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatttca gtagacacgt ccaagaagca gttctccctg
 240
 aagctgacct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtctatt actgtgcgcg aacaataagt
 300
 acgtgggtgt tcgccccctg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a
 351

<210> 402
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 402
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Ile Ser Thr Trp Trp Phe Ala Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 403
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 403
 ggtgggttcct tcagtagtta ctac
 24

<210> 404
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 404
 Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Tyr
 1 5

<210> 405
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 405
 atctttttaca gtgggagtac c
 21

<210> 406
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 406
 Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 407
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 407
 gcgcgaacaa taagtacgtg gtgggttcgcc ccc
 33

<210> 408
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 408
 Ala Arg Thr Ile Ser Thr Trp Trp Phe Ala Pro
 1 5 10

<210> 409
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 409
 gaaatagtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccaggggg aagagccacc
 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc aacaacgtag cctggtacca gcagaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccacca gggccactgg tatcccagga
 180
 aggttcagtg gcagtggggc tggaacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
 240
 gaagattttg cagttttattc ctgtcagcag tataataact ggctcacttt cggcggaggg
 300
 accaaggtgg agatcaaa
 318

<210> 410
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 410
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Leu Thr

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 85 90 95
 105

<210> 411
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 411
cagagtgtta gcaacaac
18

```
<210> 412
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 412
Gln Ser Val Ser Asn Asn
1 5

```
<210> 413
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 413
ggtgcatcc
9
```

```
<210> 414
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 414
Gly Ala Ser
1

<210> 415
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 415
 cagcagtata ataactggct cact
 24

<210> 416
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 416
 Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Leu Thr
 1 5

<210> 417
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 417
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgtag cgtctggatt cactttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct
 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atatggtatg atggaagtaa taaatactat
 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccata tccagagaca attccaagaa cacacagtat
 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gtcagtagct
 300
 acgtctgggg acttcgacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc
 360
 gtctcctca
 369

<210> 418
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 418

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

<210> 419

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 419

ggattcactt tcagtagtta tggc
24

<210> 420

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 420

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 421

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 421

atatggtatg atggaagtaa taaa
24

<210> 422
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 422
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 423
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 423
gcgtcagtag ctacgtctgg ggacttcgac tactacggta tggacgtc
48

<210> 424
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 424
Ala Ser Val Ala Thr Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 425
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 425
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagaaccacc
60
ctctcctgca gggccagtca gagaattagc acctacttag cctggtatca acagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaaa gggccactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gtagtgggtc tgggacaggc ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagtaact ggcctctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 426
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 426
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Thr Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Thr 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 Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly 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 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 427
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 427
 cagagaatta gcacctac
 18

<210> 428
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 428

Gln Arg Ile Ser Thr Tyr
1 5

<210> 429
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 429
gatgcatcc
9

<210> 430
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 430
Asp Ala Ser
1

<210> 431
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 431
cagcagcgta gtaactggcc tctcact
27

<210> 432
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 432
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 433

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 433
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgagaaagc ccgggggagtc tctgaagatc
 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttact aactactgga tcgtctgggt gcgccagatg
 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac
 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac
 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcggac accgccatgt attactgtgc gagacgggat
 300
 acgattttcc cttcctatcc cctctggggc cagggaaacc tggtcacctc ctcctca
 357

<210> 434
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 434
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Val Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Thr Ile Phe Pro Ser Tyr Pro Leu Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 435
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 435
 ggatacagct ttactaacta ctgg
 24

<210> 436
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 436
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp
 1 5

<210> 437
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 437
 atctatcctg gtgactctga tacc
 24

<210> 438
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 438
 Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
 1 5

<210> 439
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 439
 gcgagacggg atacgatttt cccttcctat cccctc
 36

<210> 440
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 440
 Ala Arg Arg Asp Thr Ile Phe Pro Ser Tyr Pro Leu
 1 5 10

<210> 441
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 441
 gatattgtga tgactcagtc tcctctctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc
 60
 atctcctgca ggtctagtca ggcctcctg aatagtaatg gatacaactt tttggattgg
 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttggtttc taatcggggc
 180
 tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc
 240
 agcagagtgg aggctgagga tattgggggtt tattactgca tgcaagctct ccaaactccg
 300
 atcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaa
 336

<210> 442
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 442
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Ala 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 Ile Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

				85					90				95		
Leu	Gln	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
								105					110		
				100											

<210> 443
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 443
 cagagcctcc tgaatagtaa tggatacaac ttt
 33

<210> 444
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 444
 Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Tyr Asn Phe
 1 5 10

<210> 445
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 445
 ttggtttct
 9

<210> 446
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 446
 Leu Val Ser
 1

<210> 447
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 447
 atgcaagctc tccaaactcc gatcacc
 27

<210> 448
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 448
 Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 449
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 449
 cagatcacct tgaaggagtc tggctcctacg ctgggtgaaac ccacacagac cctcacgctg
 60
 acctgcacct tctctggggtt ctactcagc actaatggag tgggtgtggg ctggatccgt
 120
 cagccccag gaaaggccct ggagtggctt acactcattt attggaatga aaataagcac
 180
 tacagcccat ctctgaaaaa caggatcacc atcaccaagg acacctccaa aaaccagggtg
 240
 gtccttacaa tgaccaactt ggaccctgtg gacacagcca cttattactg tgtacacagg
 300
 ggatgggttg gagcaatctt tgcctactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca
 360

<210> 450
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

```

<400> 450
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1           5           10           15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Asn
          20           25           30
Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
          35           40           45
Trp Leu Thr Leu Ile Tyr Trp Asn Glu Asn Lys His Tyr Ser Pro Ser
          50           55           60
Leu Lys Asn Arg Ile Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65           70           75           80
Val Leu Thr Met Thr Asn Leu Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85           90           95
Cys Val His Arg Gly Trp Leu Gly Ala Ile Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

```

<210> 451
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 451
gggtttctcac tcagcactaa tggagtgggt
30

```

```

<210> 452
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 452
Gly Phe Ser Leu Ser Thr Asn Gly Val Gly
 1           5           10

```

```

<210> 453
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 453

```

atttattgga atgaaaataa g
21

<210> 454
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 454
Ile Tyr Trp Asn Glu Asn Lys
1 5

<210> 455
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 455
gtacacaggg gatggttggg agcaatcttt gcctac
36

<210> 456
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 456
Val His Arg Gly Trp Leu Gly Ala Ile Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 457
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 457
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttact agttatgcca tgacctgggt ccgccaggct
120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagat attagtggta gtggtggttag aacatattac
 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tatgctgtat
 240
 ctgcaaataga acatcctgag agccgaagac acggccgtat atcattgtgc gaaggggaaca
 300
 ggccagcagg tggaccttta caactactac tatgctttgg acgtctgggg ccaagggacc
 360
 acggtcaccg tctcctca
 378

<210> 458
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 458
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ile Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Thr Gly Gln Gln Val Asp Leu Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Ala
 100 105 110
 Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 459
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 459
 ggattcacct ttactagtta tgcc
 24

<210> 460
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 460

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Ala
1 5

<210> 461

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 461

attagtggta gtggtggtag aaca
24

<210> 462

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 462

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 463

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 463

gcgaagggaa caggccagca ggtggacctt tacaactact actatgcttt ggacgtc
57

<210> 464

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 464

Ala Lys Gly Thr Gly Gln Gln Val Asp Leu Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Ala

1 5 10 15
Leu Asp Val

<210> 465
<211> 387
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 465
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt tactatggca tgcactgggt ccgccaggct
120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaacactat
180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240
ctgcaaataga acagcctgag agccgacgac acggctgtct attactgtgc gagagataag
300
ggtataagtg gaattaaggg gggttcttac tactactact atgccatgga cgtctggggc
360
caagggacca cggtcaccgt ctcctca
387

<210> 466
<211> 129
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 466
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr
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 Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr
100 105 110
Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser

<210> 467
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 467
 ggattcacct tcagttacta tggc
 24

<210> 468
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 468
 Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr Gly
 1 5

<210> 469
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 469
 atatggtatg atggaagtaa taaa
 24

<210> 470
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 470
 Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 471
 <211> 66

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 471

gcgagagata aggggtataag tggaattaag ggggggttctt actactacta ctatgccatg
60
gacgtc
66

<210> 472

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 472

Ala	Arg	Asp	Lys	Gly	Ile	Ser	Gly	Ile	Lys	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Tyr
1				5					10					15	
Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Val										
				20											

<210> 473

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 473

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc
60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgacctgggt ccgccaggct
120
ccaggggaagg ggctggagtg gggtggccgt attaaaaaca aaattgatgg tgggacaaca
180
gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg
240
gtttatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtttatta ctgttccacg
300
gtggactaca attggtactt cgatttctgg ggccgtggca ccctggtcac tgtctcctca
360

<210> 474

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 474

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

<210> 475

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 475

ggattcactt tcagtaacgc ctgg
24

<210> 476

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 476

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Ala	Trp
1				5			

<210> 477

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 477
 attaaaaaca aaattgatgg tgggacaaca
 30

<210> 478
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 478
 Ile Lys Asn Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr
 1 5 10

<210> 479
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 479
 tccacggtgg actacaattg gtacttcgat ttc
 33

<210> 480
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 480
 Ser Thr Val Asp Tyr Asn Trp Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

<210> 481
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 481
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt ttctttggca tgcactgggt ccgccaggct
 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatggtatg atggaactaa tgaaaactat
 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagtc cacgctgtat
 240
 ctgcaaatac acagtctgag agccgaggac acggctgttt actactgtgc gagagatagg
 300
 ggagtggcga catttacgag ggggaattac tactacaact acggtatgga cgtctggggc
 360
 caagggacca cggtcaccgt ctctctca
 387

<210> 482
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 482
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Glu Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Val Ala Thr Phe Thr Arg Gly Asn Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 483
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 483
 ggattcacct tcagtttctt tggc
 24

<210> 484
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 484

Gly Phe Thr Phe Ser Phe Phe Gly
1 5

<210> 485

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 485

atatggtatg atggaactaa tgaa
24

<210> 486

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 486

Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Glu
1 5

<210> 487

<211> 66

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 487

gcgagagata ggggagtggc gacatttacg agggggaatt actactacaa ctacggtatg
60
gacgtc
66

<210> 488

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 488

Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Val	Ala	Thr	Phe	Thr	Arg	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr
1				5					10					15	
Asn	Tyr	Gly	Met	Asp	Val										
			20												

<210> 489

<211> 387

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 489

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt ttctatggca tgcactgggt ccgccaggct
120
ccaggcaagg ggctggaggg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat
180
gcagactccg tgaagggccg attcaccata tccagagaca attccaagaa catgctgtat
240
ctacaaatga ccagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagattcg
300
ggtaaaactg gaactgggat aactgggtac tcctactact acggtatgga cgtctggggc
360
caagggacca cggtcaccgt ctcctca
387

```

<210> 490

<211> 129

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 490

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

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110
 115 120 125
 Ser

<210> 491
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 491
 ggattcacct tcagtttcta tggc
 24

<210> 492
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 492
 Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr Gly
 1 5

<210> 493
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 493
 atatggtatg atggaagtaa taaa
 24

<210> 494
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 494
 Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 495
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 495
 gcgagagatt cgggtaaaac tggaactggg ataactgggt actcctacta ctacggtatg
 60
 gacgtc
 66

<210> 496
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 496
 Ala Arg Asp Ser Gly Lys Thr Gly Thr Gly Ile Thr Gly Tyr Ser Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 20

<210> 497
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 497
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcactg totctggtgg ctccatcatc actaatagtt attactgggg ctggatccgc
 120
 cagccccag ggaaggtct ggagtggatt ggtagtatct attatagtg gaggacctac
 180
 tacaaccgt ccctcgagag tcgagtcacc atatccgtgg acacgtccaa gaaccagttc
 240
 tccctgaagt tgacctctgt gaccgccgca gacacggcta tatattactg tgcgagggaa
 300
 ggggatccgt cgctcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca
 354

<210> 498
 <211> 118

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 498
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ile Thr Asn
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Gly Asp Pro Ser Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 499
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 499
 ggtggctcca tcatcactaa tagttattac
 30

<210> 500
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 500
 Gly Gly Ser Ile Ile Thr Asn Ser Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 501
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 501

atctattata gtgggaggac c
21

<210> 502

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 502

Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr
1 5

<210> 503

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 503

gcgaggggaag gggatccgtc gctcgacccc
30

<210> 504

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 504

Ala Arg Glu Gly Asp Pro Ser Leu Asp Pro
1 5 10

<210> 505

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 505

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgcag cctctgggatt caccttttagc acctatgccca tgaactgggt ccgccaggct
 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcacat attagtggta gtggtggtaa ttcataactcc
 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctatat
 240
 ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccatat attactgttc gctggatata
 300
 atggctacag taggcgggtct ctttgccctac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc
 360
 tca
 363

<210> 506
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 506
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asn Ser Tyr Ser Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Leu Asp Ile Met Ala Thr Val Gly Gly Leu Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 507
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 507
 ggattcacct ttagcaccta tgcc
 24

<210> 508

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 508
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
 1 5

<210> 509
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 509
 attagtggta gtggtggtaa ttca
 24

<210> 510
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 510
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asn Ser
 1 5

<210> 511
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 511
 tcgctggata taatggctac agtaggcggt ctctttgcct ac
 42

<210> 512
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 512

Ser Leu Asp Ile Met Ala Thr Val Gly Gly Leu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 513

<211> 393

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 513

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60
tcctgtgtag cgtctggatt catcttcagt ttctatggca tgcactgggt ccgccaggct
120
ccagacaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa tgaatactat
180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgg gagagatcaa
300
ggtatttcgt attacgatat tttgactggg aattataact attactacgg tgtggacgtc
360
tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tca
393

<210> 514

<211> 131

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 514

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

	115	120	125
--	-----	-----	-----

Val Ser Ser
130

<210> 515
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 515
 ggattcatct tcagtttcta tggc
 24

<210> 516
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 516
 Gly Phe Ile Phe Ser Phe Tyr Gly
 1 5

<210> 517
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 517
 atatggtatg atggaagtaa tgaa
 24

<210> 518
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 518
 Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu
 1 5

<210> 519
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 519
 gggagagatc aaggtatttc gtattacgat attttgactg gtaattataa ctattactac
 60
 ggtgtggacg tc
 72

<210> 520
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 520
 Gly Arg Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Tyr
 1 5 10 15
 Asn Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val
 20

<210> 521
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 521
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attgggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc
 300
 caagggacac gactggagat taaa
 324

<210> 522
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 522

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

<210> 523

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 523

cagagcatta gcagctat
18

<210> 524

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 524

Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
1				5	

<210> 525

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 525

gctgcatcc
9

<210> 526
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 526
Ala Ala Ser
1

<210> 527
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 527
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc
30

<210> 528
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 528
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 529
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 529
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc
 300
 caagggacca aggtggaaat caaa
 324

<210> 530
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 530
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 531
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 531
 cagagtgtta gcagcagcta c
 21

<210> 532
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 532

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 533
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 533
ggtgcatcc
9

<210> 534
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 534
Gly Ala Ser
1

<210> 535
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 535
cagcagtatg gtagctcacc ttggacg
27

<210> 536
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 536
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 537

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 537
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60
 acctgcgctg tctatgggtg gtccttcagt ggttactact ggaactggat ccgccagccc
 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggttggggaa atcagtcata gaggaagcac caactacaac
 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca ctggacacgt ccaagaacca gttctccctg
 240
 aagctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agacgaggaa
 300
 ctggaattcc gtttctttga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca
 357

<210> 538
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 538
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser His Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 85 90 95
 Arg Asp Glu Glu Leu Glu Phe Arg Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 539
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 539
 ggtgggtcct tcagtgggtta ctac
 24

<210> 540
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 540
 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 541
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 541
 atcagtcata gaggaagcac c
 21

<210> 542
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 542
 Ile Ser His Arg Gly Ser Thr
 1 5

<210> 543
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 543
 tcgagagacg aggaactgga attccgtttc tttgactac
 39

<210> 544
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 544
 Ser Arg Asp Glu Glu Leu Glu Phe Arg Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 545
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 545
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctatttag cctgggtacca acaaaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct cgtctatggg gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
 240
 gaagattttg cattttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 546
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 546
 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 Val
 35 40 45
 Tyr Gly 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 Phe Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 85 90 105

95

<210> 547
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 547
 cagagtgtta gcagctat
 18

<210> 548
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 548
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 549
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 549
 ggtgcatcc
 9

<210> 550
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 550
 Gly Ala Ser
 1

<210> 551
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 551
 cagcagcgta gcaactggcc gctcact
 27

<210> 552
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 552
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 553
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 553
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgtag cctctggatt caccttttagc ctctatgccca tgacctgggt ccgccagggt
 120
 ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaact attagtggta gtgggtgggtg cacatactac
 180
 acagactccg ttaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat
 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgacgac acggccggttt ttactgtac gaaagagagt
 300
 acaactggaa cttactccta cttctacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc
 360
 accgtctcct ca
 372

<210> 554
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 554

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

<210> 555

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 555

ggattcacct ttagcctcta tgcc
24

<210> 556

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 556

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Tyr	Ala
1				5			

<210> 557

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 557

attagtggta gtggtggtgg caca
24

<210> 558
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 558
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr
1 5

<210> 559
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 559
acgaaagaga gtacaactgg aacttactcc tacttctacg gtatggacgt c
51

<210> 560
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 560
Thr Lys Glu Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 561
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 561
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gaccattagc agctatttaa attggatatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccctcagcgg tctccaacct
 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 562
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 562
 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 Thr Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Leu Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 563
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 563
 cagaccatta gcagctat
 18

<210> 564
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 564
Gln Thr Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 565
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 565
gctgcatcc
9

<210> 566
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 566
Ala Ala Ser
1

<210> 567
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 567
caacagagtt acagtacccc gctcact
27

<210> 568
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 568
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 569
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 569
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 570

<211> 326
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 570
 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
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 571
 <211> 326
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 571

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		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165						170					175	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
		180						185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195						200					205			
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235					240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245						250					255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		260						265					270		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg
		275					280					285			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290					295					300				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305					310					315					320
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
				325											

<210> 572

<211> 326

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 572

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					
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		
Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165						170					175	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
		195					200					205			
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235					240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245						250					255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		260						265					270		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg
		275					280					285			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290					295					300				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305					310					315					320
Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										
				325											

<210> 573

<211> 326

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 573

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		
Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
				165					170					175	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
		195					200					205			
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235					240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
				245					250					255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
			260					265					270		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg
		275					280					285			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290					295					300				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305					310					315					320
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
				325											

<210> 574

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> aa 1-478: Lag3 người (aa 29 thông qua 450 của
 NP_002277.4)
 aa 451-478: đánh dấu myc-myc-hexahistidin

<400> 574
Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
1 5 10 15
Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
20 25 30
Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Pro
35 40 45
Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
50 55 60
Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
65 70 75 80
Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
85 90 95
Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
100 105 110
Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
115 120 125
Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
130 135 140
Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
145 150 155 160
Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
165 170 175
Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
180 185 190
Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
195 200 205
Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
210 215 220
Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
225 230 235 240
Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
245 250 255
Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
260 265 270
Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe
275 280 285
Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr
290 295 300
Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu
305 310 315 320
Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu
325 330 335
Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe
340 345 350
Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro
355 360 365
Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys
370 375 380
Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr
385 390 395 400
Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala
405 410 415
Leu Pro Ala Gly His Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His
 420 435 440 445 430
 His His
 450

<210> 575
 <211> 655
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aa 1-683: Lag3 người (aa 29 thông qua 450 của
 NP_002277.4)
 aa 451-683: mIgG2aFc

<400> 575
 Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
 1 5 10 15
 Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
 20 25 30
 Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
 35 40 45
 Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 50 55 60
 Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
 85 90 95
 Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
 115 120 125
 Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
 130 135 140
 Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
 145 150 155 160
 Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
 165 170 175
 Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
 180 185 190
 Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
 195 200 205
 Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
 210 215 220
 Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
 245 250 255
 Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
 260 265 270
 Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe
 275 280 285
 Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr

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

<210> 576

<211> 516

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> aa 1-533 (aa 18 thông qua 533 của khí cynomolgus
 XP_005570011.1 bị biến đổi thay thế amino axit tại

vị trí 74 bằng P dựa trên khi nâu đỏ
XP_001108923.1

```

<400> 576
Ala Pro Val Lys Pro Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val Trp
1          5          10          15
Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro
20          25          30
Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His
35          40          45
Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro Val
50          55          60
Pro Gly His Arg Pro Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg
65          70          75          80
Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg
85          90          95
Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg
100          105          110
Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly
115          120          125
Glu Tyr Arg Ala Thr Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg
130          135          140
Leu Arg Leu Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly
145          150          155          160
Ser Leu Arg Thr Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg
165          170          175
Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Ser Arg Gly Gln Gly
180          185          190
Arg Val Pro Val Gln Gly Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe
195          200          205
Leu Phe Leu Pro His Val Gly Pro Met Asp Ser Gly Leu Trp Gly Cys
210          215          220
Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu
225          230          235          240
Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Ala Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala Gly
245          250          255
Ala Gly Ser Arg Val Glu Leu Pro Cys Arg Leu Pro Pro Ala Val Gly
260          265          270
Thr Gln Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Ala Pro Pro Gly Gly Gly Pro
275          280          285
Asp Leu Leu Val Ala Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu Glu
290          295          300
Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Ile Cys His Ile Arg Leu
305          310          315          320
Gln Gly Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr Val
325          330          335
Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu Cys
340          345          350
Glu Val Thr Pro Ala Ser Gly Gln Glu His Phe Val Trp Ser Pro Leu
355          360          365
Asn Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala Gln
370          375          380
Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu His Gln Gly
385          390          395          400
Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser Pro

```

[illegible]

```
<210> 577
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 577																
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ala	Ile	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Gln	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	Ser	Val	Ala	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	
			100					105					110			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
		115					120					125				
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	
	130					135					140					
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
145					150					155					160	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
				165					170					175		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
			180					185					190			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	
		195					200					205				
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	
	210					215					220					
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	

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

```
<210> 578
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400>	578															
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15		
Glu	Arg	Thr	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Arg	Ile	Ser	Thr	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	Lys	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	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	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
			100					105					110			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	

[illegible]

```
<210> 579
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400>	579															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5				10						15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ala	Ile	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Gln	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	Ser	Val	Ala	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	
			100					105					110			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
		115					120					125				
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	
	130					135					140					
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
145					150					155					160	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
				165					170					175		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
			180					185					190			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	
		195					200					205				
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	
	210					215					220					
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	

[illegible]

```
<210> 580
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 580															
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Gly	Glu	Ile	Ser	His	Arg	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser
				85					90					95	
Arg	Asp	Glu	Glu	Leu	Glu	Phe	Arg	Phe	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu

	130					135					140				
Gly 145	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro
Cys 225	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
Thr 305	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
Pro 385	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			

```
<210> 581
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ tổng hợp

<400> 581
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 Val

```

          35          40          45
Tyr Gly 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 Phe Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
    85          90          95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
    100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
    115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
    165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
    180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
    195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210

```

<210> 582

<211> 525

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 582

```

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				</									

```
<210> 583
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ tổng hợp

<400> 583
Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg
1 5 10 15

```
<210> 584
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 584
agcagctctg ccctcat
17
```

```
<210> 585
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

<400> 585
gctctggctg gtcttcagta tg
??

```
<210> 586
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 586
ttgccgtatg gttggtttga ac
22
```

```
<210> 587
<211> 665
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> hLAG3.Fc

<400> 587
 Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser
 20 25 30
 Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly

[illegible]

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 485 490 495
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 500 505 510
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 515 520 525
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 530 535 540
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 545 550 555 560
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 565 570 575
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 580 585 590
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 595 600 605
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 610 615 620
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 625 630 635 640
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 645 650 655
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665

<210> 588

<211> 422

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> vùng ngoại bào P18627 của hLAG3

<400> 588

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

Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
 165 170 175
 Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
 180 185 190
 Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
 195 200 205
 Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
 210 215 220
 Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
 245 250 255
 Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
 260 265 270
 Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe
 275 280 285
 Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr
 290 295 300
 Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu
 305 310 315 320
 Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu
 325 330 335
 Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe
 340 345 350
 Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro
 355 360 365
 Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys
 370 375 380
 Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr
 385 390 395 400
 Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala
 405 410 415
 Leu Pro Ala Gly His Leu
 420

<210> 589

<211> 44

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> quyết định kháng nguyên hLAG3

<400> 589

Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro
 1 5 10 15
 Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala
 20 25 30
 Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
 35 40