



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0040734

(51)^{2006.01} A61K 51/10; C07K 19/00; C07K 16/28; (13) B
A61K 51/04; C07K 16/22

-
- (21) 1-2019-02894 (22) 01/12/2017
(86) PCT/US2017/064215 01/12/2017 (87) WO/2018/102682 07/06/2018
(30) 62/428,672 01/12/2016 US; 62/457,267 10/02/2017 US; 62/569,773 09/10/2017 US
(45) 26/08/2024 437 (43) 25/11/2019 380A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591-6707, United States of America
(72) Marcus KELLY (AU); Dangshe MA (US); William OLSON (US); Gavin THURSTON (US).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)
-

(54) THẺ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ ĐƯỢC ĐÁNH DẤU BẰNG PHÓNG XẠ VÀ PHƯƠNG PHÁP CHỤP ẢNH MÔ BIỂU HIỆN PD-L1

(57) Sáng chế đề cập đến thẻ tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ được sử dụng để chụp cắt lớp phát xạ positron miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp chụp ảnh mô biểu hiện PD-L1 bằng cách chụp cắt lớp phát xạ positron.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ và sử dụng chúng để chụp cắt lớp phát xạ positron (positron emission tomography-PET) miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phối tử 1 chết theo chương trình (programmed death-ligand 1 - PD-L1) (cũng được gọi là B7-H1 hoặc CD274) là phối tử của thụ thể protein chứa 290 axit amin được biểu hiện rộng rãi trên cả mô bạch huyết và không phải mô bạch huyết như tế bào T CD4 và CD8, tế bào dòng đại thực bào, mô ngoại vi cũng như trên tế bào khối u và tế bào nhiễm virus (Dong et al 1999, Nature Med.). PD-L1 gắn kết với các thụ thể PD-1 và B7-1 thuộc họ CD28/CTLA-4 (kháng nguyên tế bào lympho T gây độc tế bào)/ ICOS (đồng tác nhân kích thích cảm ứng) của các thụ thể đồng ức chế tế bào T (Chen et al 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242) và làm giảm đáp ứng miễn dịch bằng cách ức chế sự hoạt hóa tế bào T. PD-L1 gắn kết với PD-1 hoặc B7-1 dẫn đến làm giảm sự tăng sinh tế bào T và sự tiết cytokin, can thiệp vào các đáp ứng miễn dịch thể dịch và tế bào ở các bệnh như bệnh ung thư và nhiễm virus. Sự biểu hiện của PD-L1 trên tế bào khối u và tế bào nhiễm virus được khai triển bởi khối u và nhiễm virus mạn tính để tránh đáp ứng miễn dịch. PD-L1 được biểu hiện trên rất nhiều loại khối u và các nghiên cứu về mô hình động vật đã thể hiện rằng PD-L1 trên khối u ức chế sự hoạt hóa tế bào T và làm tiêu tế bào khối u và có thể dẫn đến gia tăng sự chết tế bào T đặc hiệu khối u. Trong lây nhiễm virus mạn tính, PD-L1 được biểu hiện trên tế bào nhiễm virus gắn kết với PD-1 trên tế bào T đặc hiệu virus và tế bào T này trở thành “bị kiệt sức” vì mất chức năng tác quan và khả năng tăng sinh (Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276). Hệ PD-1: PD-L1 cũng đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển tế bào T điều hòa (Treg) cảm ứng và duy trì chức năng Treg (Francisco et al 2010, Immunol. Rev. 236: 219-242). Sự phong bế PD-L1 bằng các chất đối kháng, bao gồm các kháng thể đơn dòng, đã được nghiên cứu trong quá trình điều trị bệnh ung thư và nhiễm virus mạn tính (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519; Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276; Sheridan 2012, Nature Biotechnology 30: 729-730).

Kỹ thuật chụp cắt lớp phát xạ positron (positron emission tomography-PET) miễn dịch là công cụ chụp ảnh chẩn đoán mà sử dụng các kháng thể đơn dòng được đánh dấu bằng tác nhân phát xạ positron, kết hợp các đặc tính đích của kháng thể với độ nhạy của camera chụp cắt lớp phát xạ positron. Xem ví dụ ấn phẩm: *The Oncologist*, 12: 1379 (2007); *Journal of Nuclear Medicine*, 52(8): 1171 (2011). Kỹ thuật PET miễn dịch cho phép hiển thị hoá và định lượng mức kết lắng kháng nguyên và kháng thể *in vivo* và do đó, có thể dùng làm công cụ quan trọng cho liệu pháp điều trị chẩn đoán và hỗ trợ. Ví dụ, kỹ thuật PET miễn dịch có thể trợ giúp cho việc lựa chọn các ứng viên người bệnh tiềm năng cho liệu pháp điều trị cụ thể, cũng như theo dõi quá trình điều trị.

Do cả PD1 và PD-L1 được xuất hiện như là đích đối với liệu pháp miễn dịch, nên có nhu cầu về công cụ chẩn đoán đối với liệu pháp kháng PD1 và/hoặc kháng PD-L1, bao gồm, không kể các công cụ khác, công cụ chẩn đoán cho phép phát hiện các ứng viên người bệnh phù hợp cho liệu pháp điều trị này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ để sử dụng trong kỹ thuật chụp ảnh PET miễn dịch.

Theo một khía cạnh, thể tiếp hợp bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gốc chelat hoá, và tác nhân phát xạ positron.

Sáng chế còn đề xuất quy trình tổng hợp thể tiếp hợp đã nêu và các chất trung gian tổng hợp hữu ích cho quy trình này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp chụp ảnh mô mà biểu hiện PD-L1, trong đó phương pháp này bao gồm bước dùng thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ được mô tả trong bản mô tả này cho mô; và hiển thị hoá sự biểu hiện của PD-L1 bằng cách chụp cắt lớp phát xạ positron (PET).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện PD-L1 trong mô, trong đó phương pháp này bao gồm bước dùng thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ được mô tả trong bản mô tả này cho mô; và hiển thị hoá sự biểu hiện của PD-L1 bằng cách chụp ảnh PET. Theo một phương án, mô có ở đối tượng là người. Theo các phương án nhất định, đối tượng là động vật có vú không phải người.

Theo các phương án nhất định, đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư, bệnh viêm hoặc nhiễm trùng.

Theo một số khía cạnh, đối tượng được cho dùng liều 5mg, hoặc 10mg, hoặc 20mg thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định người bệnh phù hợp với liệu pháp điều trị kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1, phương pháp này bao gồm bước lựa chọn người bệnh mắc khối u thể rắn, cho dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ được mô tả trong bản mô tả này, và hiển thị hoá thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ được dùng trong khối u bằng cách chụp ảnh PET trong đó sự có mặt của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u nhận biết người bệnh sẽ phù hợp cho liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị khối u, phương pháp này bao gồm bước lựa chọn đối tượng mắc khối u thể rắn; xác định rằng khối u thể rắn dương tính với PD-L1; và cho đối tượng cần điều trị này dùng liệu pháp kháng khối u. Theo các phương án nhất định, liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD-L1). Theo các phương án nhất định, đối tượng được cho dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ được mô tả trong bản mô tả này, và sự định vị của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ được chụp ảnh thông qua kỹ thuật chụp cắt lớp phát xạ positron (PET) để xác định nếu khối u dương tính với PD-L1.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp theo dõi hiệu quả của liệu pháp kháng khối u ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước lựa chọn đối tượng mắc khối u thể rắn trong đó đối tượng sẽ được điều trị bằng liệu pháp kháng khối u; cho đối tượng dùng thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ được mô tả trong bản mô tả này; chụp ảnh sự định vị của thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ đã dùng trong khối u bằng cách chụp ảnh PET; và xác định sự phát triển của khối u, trong đó sự giảm từ đường cơ sở trong hấp thụ thể tiếp hợp hoặc tín hiệu được đánh dấu bằng phóng xạ cho biết sự hồi quy khối u và hiệu quả của liệu pháp kháng khối u. Theo các phương án nhất định, liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp dự đoán đáp ứng của người bệnh với liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1, phương pháp này bao gồm bước lựa chọn người bệnh mắc khối u thể rắn; và xác định nếu khối u dương tính với PD-L1, trong đó nếu khối u dương tính với PD-L1, thì cho biết sự đáp ứng tích cực của người bệnh với liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1. Theo các phương án nhất định, khối u được xác định dương tính bằng cách cho dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế và định vị thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u bằng cách chụp ảnh PET trong đó sự có mặt của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u cho biết rằng khối u dương tính với PD-L1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 mô tả SDS-PAGE và SEC của kháng thể kháng PD-L1 không cải biến và kháng thể cải biến DFO kháng PD-L1.

Fig.2A và Fig.2B mô tả SEC-HPLC phóng xạ sau khi đánh dấu bằng phóng xạ ^{89}Zr đối với nghiên cứu 1.

Fig.3 mô tả SEC-HPLC phóng xạ của thể tiếp hợp DFO (kháng PD-L1) sau khi đánh dấu bằng phóng xạ ^{89}Zr đối với nghiên cứu 2.

Fig.4 mô tả SEC-HPLC SEC phóng xạ sau khi đánh dấu bằng phóng xạ ^{89}Zr đối với nghiên cứu 3.

Fig.5 mô tả biểu đồ sắc ký UV280-SEC-HPLC và vết iTLC phóng xạ sau khi đánh dấu bằng phóng xạ ^{89}Zr đối với nghiên cứu 1.

Fig.6A, Fig.6B, Fig.6C và Fig.6D thể hiện sự biểu hiện hPD-L1 bởi dòng tế bào khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg} (Fig.6A), LOX-IMVI (Fig.6B), MDA-MB-231 (Fig.6C), và SK-Br-3 (Fig.6D) in vitro, như được mô tả trong ví dụ 5 trong bản mô tả này.

Fig.7 thể hiện sự biểu hiện hPD-L1 bởi MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg} và tế bào khối u LOX-IMVI có hoặc không có phép điều trị interferon-gama in vitro trong thử nghiệm thứ hai, như được mô tả trong ví dụ 5 trong bản mô tả này.

Fig.8 mô tả biểu đồ sắc ký được tạo ra bởi phép phân tích SEC-HPLC bằng cách sử dụng các mẫu từ chế phẩm tiếp hợp miễn dịch phóng xạ chứa thể tiếp hợp

kháng thể kháng PD-L1 ^{89}Zr -DFO đối với các nghiên cứu được thể hiện trên Fig.8A, Fig.8B, Fig.8D, và Fig.8E, và của thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ đối chứng lớp kháng thể ^{89}Zr -DFO-IgG4^P đối với các nghiên cứu được thể hiện trên Fig.8C và Fig.8F. Biểu đồ sắc ký đối với mức hấp thụ ở 280nm được thể hiện trên Fig.8A đến Fig.8C và biểu đồ sắc ký phóng xạ đối với cường độ phát ra γ được thể hiện trên Fig.8D đến Fig.8F. Trên các hình vẽ Fig.8A đến Fig.8C, dung dịch pha loãng chứa các thành phần đệm cũng được phát hiện. Các đỉnh của muối trong dung dịch đệm mẫu (thời gian duy trì >25 phút, dấu hoa thị “*”) được loại ra khỏi sự tích hợp diện tích đỉnh. Các đỉnh được đánh dấu để thể hiện thể tiếp hợp miễn dịch trọng lượng phân tử cao (HMW) (“1”), thể tiếp hợp miễn dịch monome (“2”), ^{89}Zr không hợp nhất (“3”), và các muối trong dung dịch mẫu (“*”). Chữ viết tắt: mAU = đơn vị hấp thụ tính theo mili; cps = số lượng đếm trên mỗi giây.

Fig.9 mô tả dữ liệu phân phối sinh học ex vivo đối với thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 ^{89}Zr -DFO-L1 ở chuột *PD-1^{hu/hu}-PD-L1^{hu/hu}*. Mười sáu chuột (2 nhóm, mỗi nhóm gồm 8 chuột) được cho dùng liều đơn trong tĩnh mạch 50 μCi (1mg/kg) thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 ^{89}Zr -DFO vào ngày 0 và giết vào ngày 6 (cột màu đen) hoặc ngày 10 (cột màu xám) sau dùng liều. Thu gom máu bằng cách chọc tim và xác định trọng lượng mô đã thu gom và xác định hoạt tính phóng xạ. Tỷ lệ phần trăm liều đã tiêm trên mỗi giá trị tính theo gam (%ID/g) đối với các mẫu riêng rẽ được thu gom vào ngày 6 hoặc 10 được tính toán so với hoạt tính phóng xạ của liều tiêu chuẩn từ vật liệu đã tiêm (thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 ^{89}Zr -DFO) và trọng lượng của các mẫu riêng rẽ. Dữ liệu được lập biểu đồ dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng một nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà đối tượng theo sáng chế thuộc về.

Thuật ngữ “PD-L1” dùng để chỉ phối tử 1 chết theo chương trình, cũng đã biết là CD274 và B7H1. Trình tự axit amin của PD-L1 nguyên vẹn được cung cấp trong

GenBank với số truy cập NP_054862.1. Thuật ngữ “PD-L1” cũng bao gồm các biến thể protein của PD-L1. Thuật ngữ “PD-L1” bao gồm PD-L1 tái tổ hợp hoặc mảnh của nó. Thuật ngữ này cũng bao gồm PD-L1 hoặc mảnh của nó được kết hợp với, ví dụ, histidin tag, Fc của chuột hoặc người hoặc trình tự tín hiệu như ROR1. Ví dụ, thuật ngữ này bao gồm các trình tự bao gồm Fc của chuột (mIgG2a) hoặc Fc của người (hIgG1) ở đầu C, được kết hợp với các gốc axit amin 19 đến 239 của PD-L1 nguyên vẹn (NP_054862.1). Các biến thể protein bao gồm histidin tag ở đầu C, được kết hợp với các gốc axit amin 19 đến 239 của NP_054862.1. Trừ khi được xác định dựa vào các loài không phải người, thuật ngữ “PD-L1” có nghĩa là PD-L1 của người. PD-L1 là protein có 290 axit amin với các miền tương tự IgV và tương tự IgC ngoại bào (axit amin 19 đến 239 của PD-L1 nguyên vẹn), miền xuyên màng và miền nội bào chứa khoảng 30 axit amin. PD-L1 được biểu hiện liên tục trên nhiều tế bào như tế bào trình diện kháng nguyên (ví dụ, tế bào có tua, đại thực bào và tế bào B) và trên tế bào tạo máu và không tạo máu (ví dụ, tế bào nội mô mạch, tế bào đảo tụy và vị trí ưu tiên miễn dịch). PD-L1 cũng được biểu hiện trên nhiều loại khối u và tế bào nhiễm virus và là thành phần của nhiều môi trường ngăn chặn miễn dịch (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519). PD-L1 gắn kết với một trong số hai chất đồng ức chế tế bào T PD-1 và B7-1.

Thuật ngữ “PD-1” dùng để chỉ protein chết theo chương trình 1, chất đồng ức chế tế bào T, cũng đã biết là CD279. Trình tự axit amin của PD-1 nguyên vẹn được cung cấp trong GenBank với số truy cập NP_005009.2. Thuật ngữ này cũng bao gồm PD-1 hoặc mảnh của nó được kết hợp với, ví dụ, histidin tag, Fc của chuột hoặc người hoặc trình tự tín hiệu như ROR1. Ví dụ, thuật ngữ này bao gồm trình tự bao gồm Fc của chuột (mIgG2a) hoặc Fc của người (hIgG1) ở đầu C, được kết hợp với các gốc axit amin 25 đến 170 của NP_005009.2 với sự thay đổi C93S. PD-1 là thành viên của họ CD28/CTLA-4/ICOS của chất đồng ức chế tế bào T. PD-1 là protein chứa 288 axit amin với miền ngoại bào đầu N mà là miền tương tự IgV, miền xuyên màng và miền nội bào chứa motif ức chế dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory-ITIM) và motif chuyển đổi dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (immunoreceptor tyrosine-based switch-ITSM) (Chattopadhyay et al 2009, Immunol. Rev.). Thụ thể PD-1 có hai phối tử, PD-L1 và PD-L2.

Thuật ngữ “B7-1” dùng để chỉ kháng nguyên hoạt hoá tế bào lympho T, cũng

đã biết là yếu tố đồng kích thích CD80. B7-1 là thụ thể màng chứa 288 axit amin với miền ngoại bào đầu N mà bao gồm các vùng tương tự IgV (aa 37 đến 138) và tương tự IgC (aa 154 đến 232), miền xuyên màng (aa 243 đến 263) và vùng nội bào đầu C (aa 263 đến 288). Trình tự axit amin của B7-1 nguyên vẹn được cung cấp trong GenBank với số truy cập NP_005182.1.

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 thông qua sự hoạt hoá hoặc ngăn chặn tế bào T. Thuật ngữ “chất đồng ức chế tế bào T”, cũng đã biết là phân tử đồng truyền tín hiệu tế bào T, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PD-1, protein của gen 3 hoạt hoá tế bào lympho (LAG-3, cũng đã biết là CD223), kháng nguyên 4 tế bào lympho T gây độc tế bào (CTLA-4), tác nhân giảm độc lực tế bào lympho B và T (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, globulin miễn dịch tế bào T và mucin-3 (TIM3), thụ thể miễn dịch tế bào T với globulin miễn dịch và ITIM (TIGIT; cũng đã biết là VSIG9), thụ thể 1 tương tự globulin miễn dịch kết hợp bạch cầu (LAIR1; cũng đã biết là CD305), chất đồng kích thích tế bào T cảm ứng (ICOS; cũng đã biết là CD278), B7-1 (CD80), và CD160.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả này, được 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 với nhau bằng liên kết disulfua (tức là, “phân tử kháng thể nguyên vẹn”), cũng như các multime của nó (ví dụ IgM) hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. 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 thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng quyết định bổ sung (complementarity determining region-CDR), được đặt rải rác với các vùng bảo thủ hơn, được 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 cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án nhất định, các FR của kháng thể (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) có thể giống với trình tự dòng mầm của người hoặc có thể được cải biến theo cách tự nhiên hoặc theo cách nhân tạo. Trình tự tương đồng axit amin có thể được xác định dựa vào phép phân tích cạnh bên nhau của hai hoặc nhiều CDR.

Sự thế một hoặc nhiều gốc CDR hoặc bỏ qua một hoặc nhiều gốc 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 phối để gắn kết. Padlan và cộng sự (1995 FASEB J. 9:133-139) đã phân tích các vùng hằng định giữa các kháng thể và các kháng nguyên của chúng, dựa vào các cấu trúc tinh thể đã công bố và đã kết luận rằng chỉ có khoảng một phần năm đến một phần ba gốc CDR tiếp xúc thực với kháng nguyên. Padlan cũng phát hiện ra rằng nhiều kháng thể mà trong đó một hoặc hai CDR không có axit amin tiếp xúc với kháng nguyên (cũng xem ấn phẩm: Vajdos *et al.* 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 đây (ví dụ các gốc H60-H65 trong CDRH2 thường không yêu cầu), từ các vùng Kabat CDR nằm bên ngoài Chothia CDR, bằng cách tạo mô hình phân tử và/hoặc theo kinh nghiệm. Nếu CDR hoặc (các) gốc của nó bị bỏ qua, nó thường được thế bằng axit amin chiếm giữ vị trí tương ứng trong trình tự kháng thể khác của người hoặc thể tương đồng của các trình tự này. Các vị trí để thay thế trong CDR và axit amin để thế cũng có thể được lựa chọn theo kinh nghiệm. Sự thay thế theo kinh nghiệm cũng có thể là sự thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ.

Các kháng thể đơn dòng kháng PD-L1 nguyên vẹn của người được bộc lộ trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế, chèn vào và/hoặc loại bớt axit amin trong vùng khung và/hoặc CDR của các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khi so với các trình tự dòng mầm tương ứng. Các đột biến như vậy có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với trình tự dòng mầm sẵn có, ví dụ từ cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Sáng chế bao gồm các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà được tạo ra từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc CDR được tạo đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà từ đó kháng thể được tạo ra hoặc thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác của người hoặc thành sự thay thế axit amin bảo thủ của (các) gốc dòng mầm tương ứng (trong bản mô tả này, sự thay đổi trình tự như vậy được gọi chung là “đột biến dòng mầm”). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bắt đầu với các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này,

có thể tạo ra một cách dễ dàng nhiều kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên mà bao gồm một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng rẽ hoặc sự kết hợp của chúng. 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 từ đó kháng thể được tạo ra. Theo các phương án khác, chỉ có các gốc nhất định 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 gốc của vùng khung và/hoặc CDR được tạo đột biến thành (các) gốc tương ứng của các trình tự dòng mầm khác nhau (nghĩa là, trình tự dòng mầm mà khác với trình tự dòng mầm mà từ đó kháng thể được tạo ra ban đầu). 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 CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng rẽ nhất định được tạo đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm cụ thể trong khi các gốc cụ thể 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. Khi thu được, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể được thử nghiệm một cách dễ dàng đối với một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, tính 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 là), tính gây miễn dịch giảm, v.v. Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên thu được theo cách chung này được bao gồm trong sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể đơn dòng kháng PD-L1 nguyên vẹn của người bao gồm các biến thể của 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 có một hoặc nhiều thay thế bảo thủ. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng PD-L1 có các trình tự axit amin của 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. thay thế axit amin bảo thủ so 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, được dự

định bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và vùng hằng định được tạo ra 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 nhờ quá trình đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *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 được dự định bao gồm các mAb trong đó các trình tự CDR được tạo ra từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác (ví dụ, chuột), đã được ghép vào các trình tự RF 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 các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép, đặc hiệu ba hoặc đa đặc hiệu và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu có thể đặc hiệu đối với các epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với các epitop 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 hệ multime của hai hoặc nhiều polypeptit mà được liên kết cộng 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 được đồng biểu hiện với phân tử chức 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 kết nối hoá học, dung hợp gen, liên kết không cộng hoá trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều 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 tính 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, đặc hiệu ba hoặc đa đặc hiệu hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được liên kết về mặt chức năng với kháng thể khác hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép với tính đặc hiệu gắn kết thứ hai. Các kháng thể đặc hiệu kép và 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 tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tạo ra phức hệ 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 càng nhỏ có nghĩa là gắn kết càng chặt chẽ). Các phương pháp xác định xem liệu hai phân tử có gắn kết đặc hiệu hay không cũng đã biết đến trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, sự thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt và 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 PD-L1. Hơn nữa, các kháng thể đa đặc hiệu mà gắn kết với một miền trong PD-L1 và một hoặc nhiều kháng nguyên bổ sung hoặc đặc hiệu kép mà gắn kết với hai vùng khác nhau của PD-L1 tuy nhiên không được cho là các kháng thể mà “gắn kết đặc hiệu”, như được sử dụng trong bản mô tả này.

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 bởi enzym, tổng hợp, hoặc được thao tác di truyền mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo ra phức hệ. 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 PD-L1.

Thuật ngữ “kháng thể được phân lập”, như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ kháng thể mà về cơ bản không có các kháng thể khác (Ab) có các tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể được phân lập mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1 hoặc mảnh của nó, về cơ bản không có các Ab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên không phải PD-L1).

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 sự tương tác phân tử sinh học theo thời gian thực nhờ quá trình phát hiện sự thay đổi về nồng độ protein trong lớp nền 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, được dùng để chỉ hằng số phân ly cân bằng của quá trình tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ “epitop” dùng để chỉ nhân tố 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 nhiều hơn một epitop. 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 “epitop” cũng dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc T đáp ứng với. Thuật ngữ này cũng dùng để chỉ vùng của kháng nguyên mà được gắn kết bởi kháng thể. Các epitop có thể được xác định dưới dạng cấu trúc hoặc chức năng. Các epitop chức năng thường là tập hợp con của các epitop cấu trúc và có các gốc mà trực tiếp góp phần vào ái lực tương tác. Các epitop cũng có thể là có hình dạng, tức là, gồm có các axit amin không phải mạch thẳng. Theo các phương án nhất định, các epitop có thể bao gồm các nhân tố quyết định mà là các nhóm phân tử có hoạt tính bề mặt hoá học như các axit amin, chuỗi bên của đường, các nhóm phosphoryl, hoặc các nhóm sulfonyl, và theo các phương án nhất định, có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu, và/hoặc các đặc tính điện tích đặc hiệu.

Thuật ngữ “gần như giống nhau” hoặc “về cơ bản giống nhau”, khi dùng để chỉ axit nucleic hoặc mảnh của nó, thể hiện rằng, khi được căn chỉnh tối ưu với sự thêm hoặc bớt nucleotit thích hợp bằng axit nucleic khác (hoặc sợi bổ sung của nó), có sự giống nhau về trình tự nucleotit ít nhất khoảng 90%, và tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% bazơ nucleotit, như đo được bằng thuật toán đã biết bất kỳ về sự giống nhau về trình tự, như FASTA, BLAST hoặc GAP.

Khi được áp dụng cho polypeptit, thuật ngữ “gần như tương tự” hoặc “về cơ bản tương tự” có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được căn chỉnh tối ưu, như bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT bằng cách sử dụng trọng số khe mặc định, chia sẻ ít nhất 90% trình tự giống nhau, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất 95%, 98% hoặc 99% trình tự giống nhau. Tốt hơn nữa, các vị trí gốc, mà không giống nhau, khác nhau về sự thay thế axit amin bảo thủ. Thuật ngữ “thay thế axit amin bảo thủ” là thay thế mà trong đó gốc axit amin được 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 thủ về cơ bản sẽ không làm thay đổi các đặc tính chức năng của protein. Trong các trường hợp mà trong đó hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi sự thay thế bảo thủ, tỷ lệ phần trăm hoặc mức độ tương tự có thể được điều chỉnh theo hướng hiệu chỉnh đối với bản chất bảo thủ của sự thay thế. Người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực này đã biết phương tiện để tiến hành việc điều chỉnh này. Xem ví dụ ấn phẩm: Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, nội dung của ấn phẩm này 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) các chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; 2) chuỗi bên hydroxyl béo: serin và threonin; 3) chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; 4) chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin và tryptophan; 5) chuỗi bên có tính bazơ: lysin, arginin và histidin; 6) chuỗi bên có tính axit: aspartat và glutamat và 7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo thủ 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 thủ là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận dạng log PAM250 được bộc lộ trong ấn phẩm: Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45, nội dung của ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Sự thay thế “bảo thủ ở mức độ vừa phải” là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận dạng log PAM250. Tính tương tự về trình tự đối với các polypeptit thường được đo 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 phép đo về tính tương tự được gán cho các thay thế, loại bỏ và các cải biến khác nhau khác, bao gồm các thay thế axit amin bảo thủ. Ví dụ, phần mềm GCG chứa chương trình như GAP và BESTFIT mà có thể được sử dụng với các tham số mặc định để xác định tính tương đồng về trình tự hoặc sự giống nhau về trình tự giữa các polypeptit có liên quan gần nhất, như các polypeptit tương đồng từ các loại sinh vật khác nhau hoặc giữa các protein kiểu đại và mutein của chúng. Xem ví dụ GCG phiên bản 6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh bằng cách sử dụng FASTA với các tham số mặc định hoặc được khuyến cáo; chương trình trong GCG phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) đề xuất thuật toán sự căn chỉnh và tỷ lệ phần trăm giống nhau về trình tự của các vùng xếp chồng tốt nhất giữa các trình tự truy vấn và trình tự tìm kiếm (Pearson (2000) trên đây). Thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự của đã biết 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 ấn phẩm: Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 và (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, nội dung của mỗi ấn phẩm

này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Cụm từ “lượng hữu hiệu về mặt điều trị” có nghĩa là lượng mà tạo ra tác dụng mong muốn đối với đối tượng mà nó được dùng. Lượng chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích điều trị và sẽ 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 ấn phẩm: 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 giảm, ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn như nhiễm virus mạn tính, bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn dịch.

II. Thể tiếp hợp miễn dịch được đánh dấu bằng phóng xạ của các kháng thể PD-L1 để chụp ảnh PET miễn dịch

Sáng chế đề xuất protein gắn kết kháng nguyên được đánh dấu bằng phóng xạ mà gắn kết với phối tử 1 chết theo chương trình (PD-L1). Theo một số phương án, protein gắn kết kháng nguyên được đánh dấu bằng phóng xạ bao gồm protein gắn kết kháng nguyên được liên kết cộng hoá trị với một hoặc nhiều gốc chelat hoá, mà là các gốc hoá học mà có khả năng chelat hóa tác nhân phát xạ positron.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất protein gắn kết kháng nguyên mà gắn kết với PD-L1, ví dụ kháng thể, trong đó protein gắn kết kháng nguyên mà gắn kết với PD-L1 được liên kết cộng hoá trị với một hoặc nhiều gốc có công thức sau:



trong đó L là gốc chelat hoá; M là tác nhân phát xạ positron; và z trong mỗi trường hợp độc lập với nhau là 0 hoặc 1; và trong đó ít nhất một trong số z là 1.

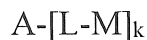
Theo một số phương án, protein gắn kết kháng nguyên được đánh dấu bằng phóng xạ là hợp chất có công thức (I):



(I)

A là protein mà gắn kết với PD-L1; L là gốc chelat hoá; M là tác nhân phát xạ positron; z là 0 hoặc 1; và k là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 30. Theo một số phương án, k là 1.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết kháng nguyên được đánh dấu bằng phóng xạ là hợp chất có công thức (II):



(II)

trong đó A là protein mà gắn kết với PD-L1; L là gốc chelat hoá; M là tác nhân phát xạ positron; và k là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 30.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa thể tiếp hợp có công thức sau:



trong đó A là protein mà gắn kết với PD-L1; L là gốc chelat hoá; và k là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 30; trong đó thể tiếp hợp được chelat hoá với tác nhân phát xạ positron với lượng đủ để tạo ra hoạt tính đặc hiệu phù hợp để chụp ảnh PET lâm sàng.

Protein gắn kết phù hợp, gốc chelat hoá và tác nhân phát xạ positron được đề xuất dưới đây.

A. Protein gắn kết PD-L1

Protein gắn kết PD-L1 thích hợp là các protein mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1, bao gồm các protein được mô tả trong công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, nội dung của patent Mỹ này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các kháng thể kháng PD-L1 làm ví dụ của sáng chế được liệt kê trong bảng 1 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, cũng được thể hiện dưới đây.

Bảng 1: Thông tin nhận biết trình tự axit amin

	Trình tự SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M8306N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M8307N	18	20	22	24	26	28	30	32

H2M8309N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M8310N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M8312N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M8314N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M8316N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M8317N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M8321N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M8323N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M8718N	162	164	166	168	170	172	174	176
H2M8718N2	178	180	182	184	170	172	174	176
H2M8719N	186	188	190	192	194	196	198	200
H1H9323P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1H9327P	218	220	222	224	226	228	230	232
H1H9329P	234	236	238	240	242	244	246	248
H1H9336P	250	252	254	256	258	260	262	264
H1H9344P2	266	268	270	272	274	276	278	280
H1H9345P2	282	284	286	288	274	276	278	280
H1H9351P2	290	292	294	296	274	276	278	280
H1H9354P2	298	300	302	304	274	276	278	280
H1H9364P2	306	308	310	312	274	276	278	280
H1H9373P2	314	316	318	320	274	276	278	280
H1H9382P2	322	324	326	328	274	276	278	280
H1H9387P2	330	332	334	336	274	276	278	280

H1H9396P2	338	340	342	344	274	276	278	280
-----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Bảng 1 thể hiện thông tin nhận biết trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), các vùng quyết định bổ sung chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3), và các vùng quyết định bổ sung chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của các kháng thể kháng PD-L1 làm ví dụ.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm HCVR chứa 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 tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm LCVR chứa 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 tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm 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 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 kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD-L1 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 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, 178/170, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/274, 290/274, 298/274, 306/274, 314/274, 322/274, 330/274, và 338/274. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ một trong số SEQ ID NO: 82/90 (ví dụ, H2M8314N), 162/170 (ví dụ, H2M8718N), 306/274 (ví dụ, H1H9364P2), và 314/274 (ví dụ, H1H9373P2). Theo các phương án khác nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ một trong số SEQ ID NO:

98/106 (ví dụ, H2M8316N), 146/154 (ví dụ, H2M8323N), 290/274 (ví dụ, H1H9351P2), và 330/274 (ví dụ, H1H9387P2).

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) chứa 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 tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) chứa 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 tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) chứa 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 tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) chứa 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 tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) chứa 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 tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) chứa 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 tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm cặp trình tự axit amin HCDR3 và LCDR3 (HCDR3/LCDR3) chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong bảng 1 ghép vấp 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 kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD-L1 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 SEQ ID NO: 88/96 (ví dụ, H2M8314N), 168/176 (ví dụ, H2M8718N), 312/280 (ví dụ, H1H9364P2), và 320/280 (ví dụ, H1H9373P2). Theo các phương án nhất định khác, cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NOs: 104/112 (ví dụ, H2M8316N), 152/160 (ví dụ, H2M8323N), 296/280 (ví dụ, H1H9351P2), và 336/280 (ví dụ, H1H9387P2).

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm tập hợp gồm sáu CDR (nghĩa là, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD-L1 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 SEQ ID NO: 84-86-88-92-94-96 (ví dụ, H2M8314N); 164-166-168-172-174-176 (ví dụ, H2M8718N); 308-310-312-276-278-280 (ví dụ, H1H9364P2); và 316-318-320-276-278-280 (ví dụ, H1H9373P2). Theo các phương án nhất định khác, tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 100-102-104-108-110-112 (ví dụ, H2M8316N); 148-150-152-156-158-160 (ví dụ, H2M8323N); 292-294-296-276-278-280 (ví dụ, H1H9351P2); và 332-334-336-276-278-280 (ví dụ, H1H9387P2).

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm tập hợp gồm có sáu CDR (nghĩa là, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như được

xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD-L1 làm ví dụ được liệt kê trong bảng 1. Ví dụ, theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 82/90 (ví dụ, H2M8314N), 98/106 (ví dụ, H2M8316N), 146/154 (ví dụ, H2M8323N), 162/170 (ví dụ, H2M8718N), 290/274 (ví dụ, H1H9351P2), 306/274 (ví dụ, H1H9364P2), 314/274 (ví dụ, H1H9373P2) và 330/274 (ví dụ, H1H9387P2). Đã biết các phương pháp và kỹ thuật để 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 đã xác định được bộc lộ trong bản mô tả này. Các quy ước điển hình mà có thể được sử dụng để nhận biết các đường biên của CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia và định nghĩa AbM. Trong các thuật ngữ chung, định nghĩa Kabat được dựa vào tính biến đổi của trình tự, định nghĩa Chothia được dựa vào vị trí của vùng cấu trúc dạng vòng và định nghĩa AbM là thỏa hiệp giữa phương pháp Kabat và Chothia. Xem ví dụ ấn phẩm: Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Cơ sở dữ liệu công khai cũng khả dụng để nhận biết trình tự CDR trong kháng thể.

Theo một số phương án, các protein gắn kết là các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà cạnh tranh để gắn kết đặc hiệu với PD-L1 với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm 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 một số phương án, protein gắn kết là các kháng thể phân lập và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1 có thể gắn kết với cùng một epitop trên PD-L1 như PD-1/B7-1 hoặc có thể gắn kết với các epitop khác nhau trên PD-L1 như PD-1/B7-1. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế

mà phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1 bao gồm các CDR của HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự HCVR được liệt kê trong bảng 1; và các CDR của 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 khác, sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà không phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được phân lập mà gắn kết với PD-L1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó làm tăng cường sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được phân lập mà làm tăng cường sự gắn kết của PD-L1 với PD-1/B7-1 bao gồm các CDR của HCVR, trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 18, 66, 114, 130, 202, 218, 266, 282, 298, 322 và 338; và các CDR của LCVR, trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 26, 74, 122, 138, 210, 226, và 274. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được phân lập bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 18/26 (ví dụ, H2M8307N), 66/74 (ví dụ, H2M8312N), 114/122 (ví dụ, H2M8317N), 130/138 (ví dụ, H2M8321N), 202/210 (ví dụ, H1H9323P), 218/226 (ví dụ, H1H9327P), 266/274 (ví dụ, H1H9344P2), 282/274 (ví dụ, H1H9345P2), 298/274 (ví dụ, H1H9354P2), 322/274 (ví dụ, H1H9382P2), và 338/274 (ví dụ, H1H9396P2).

Theo một số phương án, protein gắn kết là các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1 từ người hoặc các loài khác. Theo các phương án nhất định, kháng thể có thể gắn kết với PD-L1 của người và/hoặc với PD-L1 của khỉ cynomolgus.

Theo một số phương án, protein gắn kết là các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà cạnh tranh chéo để gắn kết với PD-L1 với kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm 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 một phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được phân lập mà có một hoặc nhiều đặc điểm sau: (a) phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1; (b) gắn kết đặc hiệu với PD-L1 của người và/hoặc PD-L1 của khỉ cynomolgus; (c) ức chế sự tăng sinh tế bào T trong thử nghiệm phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR); và (d) làm gia tăng sự tiết IL-2 và/hoặc interferon-gama trong thử nghiệm MLR.

Theo một số phương án, protein gắn kết là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể gắn kết đặc hiệu với PD-L1 theo cách chủ vận, nghĩa là nó làm tăng cường hoặc kích thích sự gắn kết và/hoặc hoạt tính của PD-L1; theo các phương án khác, kháng thể có thể gắn kết đặc hiệu với PD-L1 theo cách chủ vận, tức là nó phong bế PD-L1 không gắn kết với thụ thể của nó.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu kép bao gồm tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất với PD-L1 và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai đối với epitop đích thứ hai. Epitop đích thứ hai có thể là epitop khác trên PD-L1 hoặc trên protein khác chẳng hạn như chất đồng ức chế tế bào T. Theo các phương án nhất định, epitop đích có thể trên tế bào khác bao gồm *ví dụ*, tế bào T, tế bào B, tế bào khối u, tế bào mô tự miễn dịch hoặc tế bào nhiễm virus khác.

Theo một số phương án, kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể gắn kết với PD-L1 monome (*ví dụ*, ở 25°C hoặc ở 37°C) với K_D nhỏ hơn khoảng 318pM như đo được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với PD-L1 monome với K_D nhỏ hơn khoảng 300pM, nhỏ hơn khoảng 250pM, nhỏ hơn khoảng 150pM, nhỏ hơn khoảng 100pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 50pM, như đo được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Theo một số phương án, kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với PD-L1 dime (*ví dụ*, ở 25°C hoặc ở 37°C) với K_D nhỏ hơn khoảng 15pM như đo

được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1 hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với PD-L1 dime với K_D nhỏ hơn khoảng 12pM, nhỏ hơn khoảng 10pM, nhỏ hơn khoảng 8pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 5pM, như đo được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với PD-L1 của khỉ cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (*ví dụ*, ở 25°C hoặc ở 37°C) với K_D nhỏ hơn khoảng 28nM như đo được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với PD-L1 của khỉ cynomolgus với K_D nhỏ hơn khoảng 25nM, nhỏ hơn khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 15nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 5 nM, như đo được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Theo một số phương án, kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với PD-L1 với chu kỳ bán rã phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 1 phút như đo được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với PD-L1 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, hoặc lớn hơn khoảng 800 phút, như đo được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, *ví dụ*, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580

A1 (ví dụ, dạng thu nạp mAb hoặc dạng thu nạp kháng nguyên) hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 770 pM như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch dựa trên ELISA, ví dụ, như được thể hiện trong ví dụ 4 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự gắn kết của PD-L1 với B7-1 với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 10nM như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch dựa vào ELISA, ví dụ, như được thể hiện trong ví dụ 4 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với PD-L1 và làm tăng cường sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1.

Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với miền ngoại bào của PD-L1 hoặc với mảnh của miền này. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với nhiều hơn một miền (kháng thể phản ứng chéo). Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết với epitop nằm trong miền ngoại bào bao gồm các gốc axit amin 19 đến 239 của NP_054862.1.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể thực hiện chức năng bằng cách phong bế hoặc ức chế hoạt tính gắn kết với PD-1 hoặc gắn kết với B7-1 liên quan đến PD-L1 bằng cách gắn kết với vùng hoặc mảnh khác bất kỳ của protein nguyên vẹn. Theo các phương án nhất định, kháng thể làm giảm hoặc điều biến sự tương tác giữa PD-L1 và PD-1/B7-1.

Theo các phương án nhất định, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép có thể gắn kết một epitop trong một miền và cũng có thể gắn kết epitop thứ hai trong miền khác của PD-L1. Theo các phương án nhất định, kháng thể đặc hiệu kép gắn kết hai epitop khác nhau trong cùng một miền. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ nhất trong đó tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất bao gồm miền ngoại bào hoặc mảnh của nó của PD-1; và tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ hai với epitop khác

của PD-L1. Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu bao gồm tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ nhất trong đó tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm miền ngoại bào hoặc mảnh của nó của B7-1; và tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ hai với epitop khác của PD-L1.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó là kháng thể đơn dòng nguyên vẹn của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với PD-L1, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm sau: (i) bao gồm HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 186, 202, 218, 234, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314, 322, 330 và 338, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; (ii) bao gồm LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 194, 210, 226, 242, 258, và 274, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; (iii) bao gồm miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 280, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336 và 344, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264, và 280, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; (iv) bao gồm miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332, và 340, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334, và 342, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260, và 276, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất

là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262, và 278, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; (v) là phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu bao gồm tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất với PD-L1 và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai với kháng nguyên được chọn từ nhóm gồm có PD-L1, kháng nguyên đặc hiệu khối u, kháng nguyên tế bào nhiễm virus và chất đồng ức chế tế bào T; (vi) gắn kết với PD-L1 của người với K_D nằm trong khoảng từ 4pM đến 645nM; (vii) gắn kết với PD-L1 của khỉ cynomolgus với K_D nằm trong khoảng từ 70pM đến 400nM; (viii) phong bế hoặc làm tăng cường sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 với $IC_{50} \leq 770pM$; (ix) phong bế hoặc làm tăng cường sự gắn kết của PD-L1 với B7-1 với $IC_{50} \leq 10nM$; (x) phong bế sự điều chỉnh giảm của tế bào T cảm biến PD-1 và/hoặc giải thoát báo hiệu tế bào T trong thử nghiệm thông báo tế bào T/APC luxiferaza; (xi) kích thích tăng sinh và hoạt tính tế bào T trong thử nghiệm phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR); (xii) cảm ứng việc tạo ra IL-2 và/hoặc IFN γ trong thử nghiệm MLR; và (xiii) ngăn chặn sự phát triển khối u và làm gia tăng sự sống ở đối tượng mắc bệnh ung thư.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó là kháng thể đơn dòng nguyên vẹn của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm sau: (i) bao gồm HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 82, 98, 146, 162, 290, 306, 314, và 330, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; (ii) bao gồm LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 90, 106, 154, 170, và 274, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; (iii) bao gồm miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 88, 104, 152, 168, 296, 312, 320, và 336, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 96, 112, 160, 176, và 280, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; (iv) bao

gồm miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 84, 100, 148, 164, 292, 308, 316, và 332, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 86, 102, 150, 166, 294, 310, 318, và 334, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 92, 108, 156, 172, và 276, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 94, 110, 158, 174, và 278, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% trình tự giống nhau; (v) là phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu bao gồm tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất với PD-L1 và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai với kháng nguyên được chọn từ nhóm gồm có epitop khác của PD-L1, kháng nguyên đặc hiệu khối u, kháng nguyên tế bào nhiễm virus và chất đồng ức chế tế bào T; (vi) gắn kết với PD-L1 của người với $K_D \leq 10^{-10}M$; (vii) gắn kết với PD-L1 của khỉ cynomolgus với $K_D \leq 10^{-7}M$; (viii) phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1; (ix) phong bế sự điều chỉnh giảm của tế bào T cảm biến PD-1 và/hoặc giải thoát truyền tín hiệu tế bào T trong thử nghiệm thông báo tế bào T/APC luxiferaza; (xi) kích thích sự tăng sinh và hoạt hóa tế bào T trong thử nghiệm phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR); (xii) cảm ứng sự tạo ra IL-2 và/hoặc IFN γ trong thử nghiệm MLR; và (xiii) ngăn chặn sự phát triển khối u và làm gia tăng sự sống ở đối tượng mắc bệnh ung thư.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-L1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết epitop trong vùng bất kỳ hoặc nhiều vùng được lấy làm ví dụ trong PD-L1, ở dạng tự nhiên hoặc được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, hoặc với mảnh của nó. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với vùng ngoại bào bao gồm một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm có các gốc axit amin từ 19 đến 239 của PD-L1. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với vùng bao gồm một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm có các gốc axit amin từ 1 đến 221 của PD-L1 của khỉ cynomolgus.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế, như được thể hiện

trong bảng 1, tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 19 đến vị trí 130 của PD-L1; hoặc các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 130 đến vị trí 153 của PD-L1; hoặc các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 153 đến vị trí 210 của PD-L1; hoặc các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 210 đến vị trí 239 của PD-L1.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-L1 gắn kết với cùng một epitop hoặc một phần của epitop, như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể làm ví dụ đặc hiệu 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, các kháng thể thích hợp cũng bao gồm kháng thể kháng PD-L1 mà cạnh tranh để gắn kết với PD-L1 hoặc mảnh PD-L1 với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể làm ví dụ đặc hiệu 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, các kháng thể phù hợp bao gồm kháng thể kháng PD-L1 mà cạnh tranh chéo để gắn kết với PD-L1 với một hoặc nhiều kháng thể như được xác định trong ví dụ 6 của bản mô tả này (ví dụ, H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2, và H2aM8306N). Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng PD-L1 mà cạnh tranh chéo để gắn kết với PD-L1 với một hoặc nhiều kháng thể như được xác định trong ví dụ 6 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1 (ví dụ, H1H9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1H9323P, H1H9382P2, H1H9344P2, H1H9345P2 và H1H9354P2).

Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này gắn kết đặc hiệu với PD-L1 và điều biến sự tương tác của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1. Kháng thể kháng PD-L1 có thể gắn kết với PD-L1 với ái lực cao hoặc với ái lực thấp. Theo các phương án nhất định, kháng thể là các kháng thể phong bế trong đó kháng thể gắn kết với PD-L1 và phong bế sự tương tác của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1. Theo một số phương án, các kháng thể phong bế theo sáng chế phong bế sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1 và/hoặc kích thích hoặc làm tăng cường sự hoạt hoá tế bào T. Theo một số phương án, các kháng thể phong bế 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 mạn tính. Các kháng thể khi được dùng cho đối tượng cần

dùng này có thể làm giảm sự nhiễm trùng mãn tính do virus như HIV, LCMV hoặc HBV ở đối tượng. Chúng 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 riêng hoặc dưới dạng liệu pháp bổ trợ với các gốc điều trị khác hoặc các phương thức đã biết trong lĩnh vực điều trị bệnh ung thư hoặc nhiễm virus. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-L1 mà gắn kết với PD-L1 với ái lực thấp được sử dụng dưới dạng phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu trong đó tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất gắn kết với PD-L1 với ái lực thấp và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai gắn kết với kháng nguyên được chọn từ nhóm gồm có epitop khác nhau của PD-L1, chất đồng ức chế tế bào T như PD-1, kháng nguyên đặc hiệu khối u và kháng nguyên đặc hiệu tế bào lympho nhiễm.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể chủ vận, trong đó kháng thể gắn kết với PD-L1 và làm tăng cường sự tương tác của PD-L1 và PD-1/B7-1. Theo một số phương án, kháng thể hoạt hoá làm tăng cường sự gắn kết của PD-L1 với PD-1 hoặc với B7-1 và/hoặc ức chế hoặc ngăn chặn sự hoạt hoá tế bào T. Các kháng thể hoạt hoá theo sáng chế có thể là hữu ích để ức chế đáp ứng miễn dịch ở đối tượng và/hoặc để điều trị bệnh tự miễn dịch.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-L1 là các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu, trong đó chúng bao gồm tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất với PD-L1 và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai với kháng nguyên được chọn từ nhóm gồm có epitop khác nhau của PD-L1, chất đồng ức chế tế bào T như PD-1, kháng nguyên đặc hiệu khối u và kháng nguyên đặc hiệu tế bào lympho nhiễm. Theo các phương án nhất định, tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất gắn kết với PD-L1 với ái lực thấp, *ví dụ*, với K_D là 10^{-8} M, 10^{-7} M hoặc lớn hơn.

Các kháng thể kháng PD-L1 nhất định theo sáng chế có thể gắn kết với và làm trung hoà hoạt tính của PD-L1, như được xác định bởi các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo*. Khả năng của kháng thể theo sáng chế gắn kết với và làm trung hoà hoạt tính của PD-L1 có thể đo được 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, được mô tả trong bản mô tả này.

Các thử nghiệm *in vitro* làm ví dụ không hạn chế để đo hoạt tính gắn kết được

minh hoạ trong ví dụ 3 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1. Trong ví dụ 3, các ái lực gắn kết và hằng số động học của kháng thể kháng PD-L1 của người đối với PD-L1 của người và PD-L1 của khỉ cynomolgus được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt và các phép đo được thực hiện trên thiết bị T200 Biacore. Trong các ví dụ 4 và 5 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, các thử nghiệm phong bế được sử dụng để xác định khả năng của kháng thể kháng PD-L1 phong bế khả năng gắn kết PD-L1 của PD-1 hoặc với B7-1 *in vitro*. Trong ví dụ 6 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, các thử nghiệm phong bế được sử dụng để xác định sự cạnh tranh chéo giữa các kháng thể kháng PD-L1 khác nhau. Ví dụ 7 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1 mô tả sự gắn kết của kháng thể với tế bào biểu hiện quá mức PD-L1. Trong ví dụ 8 của công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, thử nghiệm luxiferaza được sử dụng để xác định khả năng của kháng thể kháng PD-L1 đối kháng báo hiệu PD-1/PD-L1 trong tế bào T.

Trừ khi có quy định rõ ràng khác, thuật ngữ “kháng thể” như được sử dụng trong bản mô tả này, nên được hiểu là bao gồm các phân tử kháng thể bao gồm hai chuỗi nặng globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (nghĩa là, “phân tử kháng thể nguyên vẹn”) cũng như mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Các thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể, “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể và tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein có trong tự nhiên, thu được bởi enzym, tổng hợp hoặc được thao tác di truyền mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo ra phức hệ. 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 PD-L1. Mảnh kháng thể có thể bao gồm mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, mảnh Fv, mảnh dAb, mảnh chứa CDR, hoặc CDR được phân lập. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” dùng để chỉ polypeptit hoặc mảnh của nó 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, miền ngoại bào của PD-1 mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1. Các mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được tạo ra, *ví dụ*, từ các phân tử kháng thể nguyên vẹn bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như kỹ thuật 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 miền biến đổi và miền

hằng định (tuỳ ý) của kháng thể. ADN này đã biết 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 tạo trình tự và được thao tác về mặt hoá học hoặc bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, *ví dụ*, để sắp xếp một hoặc nhiều miền biến đổi và/hoặc hằng định thành cấu hình phù hợp hoặc đưa vào các codon, để tạo ra các gốc xystein, cải biến, bổ sung hoặc loại bớt axit amin, v.v..

Các ví dụ không hạn chế về các mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm: (i) các mảnh Fab; (ii) các mảnh $F(ab')_2$; (iii) các mảnh Fd; (iv) các mảnh Fv; (v) các phân tử chuỗi đơn Fv (scFv); (vi) các 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 quyết định bổ sung được phân lập (CDR) như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc. Các phân tử đã thao tác khác, như kháng thể đặc hiệu miền, kháng thể miền đơn, kháng thể loại bỏ miền, kháng thể khảm, 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 khối nhỏ (SMIP), và các miền IgNAR biến đổi shark, cũng được bao gồm trong cụm từ “mảnh gắn kết kháng nguyên”, như được sử dụng trong bản mô tả này.

Mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường bao gồm ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích cỡ bất kỳ hoặc thành phần axit amin và sẽ thường bao gồm ít nhất một CDR, mà liên kết với hoặc trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong các mảnh gắn kết kháng nguyên có miền V_H được kết hợp với miền V_L , các miền V_H và V_L có thể phù hợp liên quan đến miền khác trong cách bố trí phù hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ hoặc $V_L - V_L$ dime. 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. Cấu tạo làm ví dụ không hạn chế của các miền biến đổi và 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)

$V_L -CH_1-CH_2$; (xii) $V_L -CH_1-CH_2-CH_3$; (xiii) $V_L -CH_2-CH_3$; và (xiv) $V_L -CL$. Theo cấu tạo bất kỳ của các miền biến đổi và hằng định, bao gồm cấu tạo bất kỳ trong số các cấu tạo làm ví dụ 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 với vùng bản lề hoặc vùng liên kết đầy đủ hoặc một phần. Vùng bản lề có thể gồm có ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều) axit amin, mà dẫn đến liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa các miền biến đổi và/hoặc hằng định liên 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 multime khác) có cấu tạo bất kỳ trong số các cấu tạo của miền biến đổi và hằng định được liệt kê trên đây theo sự kết hợp không cộng hoá trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L monome (ví dụ, (các) liên kết disulfua).

Như với các phân tử kháng thể nguyên vẹn, các mảnh gắn kết kháng nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thường sẽ 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 biệt hoặc với epitop khác nhau 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 bối 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.

Kháng thể kháng PD-L1 và mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm các protein có các trình tự axit amin khác với trình tự của các kháng thể được mô tả, nhưng vẫn có khả năng gắn kết PD-L1. Các kháng thể biến thể và mảnh kháng thể như vậy bao gồm một hoặc nhiều bổ sung, loại bớt hoặc thay thế axit amin khi so với trình tự gốc, nhưng thể hiện hoạt tính sinh học mà gần như tương đương với hoạt tính sinh học của các kháng thể theo sáng chế. Tương tự, các trình tự ADN mã hoá kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự mà có một hoặc nhiều bổ sung, loại bớt 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 tương đương

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

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

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên 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 gia tăng nguy cơ tác dụng phụ như mong đợi, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng đối với tính sinh miễn dịch hoặc hiệu quả giảm, khi so với liệu pháp điều trị liên tục mà không có sự chuyển đổi như vậy.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên tương đương sinh học nếu chúng hoạt động theo cơ chế chung hoặc các cơ chế tác dụng đối tình trạng bệnh hoặc các tình trạng bệnh sử dụng, đến mức độ mà các cơ chế như vậy đã biết.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và/hoặc *in vitro*. Các biện pháp tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác, mà trong đó nồng độ kháng thể hoặc chất chuyển hoá của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh hoặc dịch sinh học khác theo thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà có tương quan và dự đoán phù hợp 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 dược lý cấp tính phù hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo theo thời gian; và (d) thử nghiệm lâm sàng có kiểm soát mà thiết lập độ an toàn, hiệu quả hoặc mức sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng

thể.

Các biến thể tương đương sinh học của kháng thể của sáng chế có thể được tạo cấu trúc, ví dụ, bằng cách tạo ra các thay thế khác nhau của các gốc hoặc các trình tự hoặc loại bớt các gốc đầu cuối hoặc các gốc ở giữa hoặc các trình tự không cần thiết cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc xystein không thiết yếu đối với hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc được thay thế bằng các axit amin khác để ngăn không cho tạo ra các cầu disulfua nội phân tử không cần thiết hoặc không chính xác. Theo cách khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể kháng thể bao gồm các thay đổi axit amin, mà cải biến các đặc điểm glycosyl hoá của kháng thể, ví dụ, các đột biến mà loại bớt hoặc loại bỏ quá trình glycosyl hoá.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng PD-L1 bao gồm miền Fc chứa 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 khi so với độ pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng PD-L1 chứa đột biến trong vùng C_H2 hoặc C_H3 của miền Fc, trong đó (các) đột biến làm gia tăng ái lực của miền Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong cơ quan nội bào mà trong đó pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Các đột biến như vậy có thể dẫn đến làm gia tăng chu kỳ bán rã trong huyết thanh của kháng thể khi được dùng cho động vật. Các ví dụ không hạn chế về các cải biến Fc như vậy bao gồm, ví dụ, cải biến 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 cải biến 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 cải biến ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc cải biến ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, cải biến bao gồm cải biến 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); cải biến 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); cải biến 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); cải biến 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); cải biến 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và cải biến 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P). Theo phương án khác nữa, cải biến bao gồm cải biến 265A (ví dụ, D265A) và/hoặc 297A (ví dụ, N297A).

Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng PD-L1 bao gồm miền Fc chứa 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 bao gồm kháng thể kháng PD-L1 bao gồm miền Fc chứa 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 có của các đột biến miền Fc nêu trên và các đột biến khác trong miền biến đổi kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này, được dự định nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng PD-L1 chứa vùng hằng định chuỗi nặng khảm (C_H), trong đó vùng C_H khảm bao gồm các đoạn được tạo ra từ các vùng C_H của nhiều hơn một lớp kháng thể globulin miễn dịch. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm vùng C_H khảm bao gồm một phần hoặc tất cả miền C_{H2} được tạo ra 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, 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 vị trí 216 đến 227 theo cách đánh số EU) được tạo ra 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 vị trí 228 đến 236 theo cách đánh số EU) được tạo ra 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 được tạo ra từ bản lề trên IgG1 của người hoặc IgG4 của người và các gốc axit amin được tạo ra 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, có thể có các chức năng tác quan Fc cải biến mà không làm ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính điều trị hoặc dược động học của kháng thể. (Xem, ví dụ ấn phẩm: USSN. 14/170,166, nộp ngày 31 tháng 1 năm 2014, nội dung của ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

B. Tác nhân phát xạ positron và gốc chelat hoá

Tác nhân phát xạ positron bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tác nhân

mà tạo ra phức hệ ổn định với gốc chelat hoá và có chu kỳ bán rã vật lý phù hợp cho mục đích chụp ảnh PET miễn dịch. Các tác nhân phát xạ positron minh hoạ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{44}Sc , và ^{86}Y . Tác nhân phát xạ positron phù hợp cũng bao gồm các tác nhân mà gắn kết trực tiếp với protein gắn kết PD-L1, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, ^{76}Br và ^{124}I , và các tác nhân mà được đưa vào thông qua nhóm giả, ví dụ, ^{18}F .

Các gốc chelat hoá được mô tả trong bản mô tả này là các gốc hoá học mà được liên kết cộng hoá trị với protein gắn kết PD-L1, ví dụ, kháng thể kháng PD-L1 và bao gồm phần có khả năng chelat hóa tác nhân phát xạ positron, nghĩa là có khả năng phản ứng với tác nhân phát xạ positron để tạo ra phức hệ chelat phối hợp. Các gốc phù hợp bao gồm các gốc mà cho phép lượng hữu hiệu của kim loại cụ thể và tạo ra phức hệ kim loại-tác nhân chelat hoá mà ổn định đáng kể *in vivo* để sử dụng chẩn đoán, ví dụ, chụp ảnh PET miễn dịch. Các gốc chelat hoá minh hoạ bao gồm các gốc mà làm giảm thiểu sự phân ly của tác nhân phát xạ positron và tích tụ trong xương khoáng, protein huyết tương và/hoặc tuỷ xương kết lắng đến mức độ phù hợp để sử dụng chẩn đoán.

Các ví dụ về các gốc chelat hoá bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gốc mà tạo ra phức hệ ổn định với tác nhân phát xạ positron ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{44}Sc , và/hoặc ^{86}Y . Các gốc chelat hoá minh hoạ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gốc được mô tả trong ấn phẩm: *Nature Protocols*, 5(4): 739, 2010; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); *Chem Commun (Camb)*, 51(12): 2301 (2015); *Mol. Pharmaceutics*, 12: 2142 (2015); *Mol. Imaging Biol.*, 18: 344 (2015); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 37:250 (2010); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* (2016). doi:10.1007/s00259-016-3499-x; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); công bố đơn quốc tế số WO 2015/140212A1; và patent Mỹ số US 5,639,879.

Các gốc chelat hoá minh hoạ cũng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gốc mà bao gồm desferioxamin (DFO), axit 1,4,7,10-tetraaxetic (DOTA), axit diethylentriaminpentaaxetic (DTPA), axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), axit (1,4,7,10-Tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetra(metylen phosphonic) (DOTP), axit 1R, 4R, 7R, 10R)-□□□□-Tetrametyl-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic (DOTMA), axit 1,4,8,11-Tetraazaxyclotetradecan-1,4,8, 11-tetraaxetic (TETA), H₄octapa, H₆phospa, H₂dedpa, H₅decapa, H₂azapa, HOPO, DO2A, 1,4,7,10-

Tetrakis(carbamoylmethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan (DOTAM), axit 1,4,7-triazaxyclononan-N,N',N''-triacetic (NOTA), 1,4,7,10-Tetrakis(carbamoylmethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan (DOTAM), axit 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4,11-dixetic (CB-TE2A), 1,4,7,10-Tetraazaxyclododecan (Cyclen), 1,4,8,11-Tetraazaxyclotetradecan (Cyclam), tác nhân chelat hoá octadentat, tác nhân chelat hoá hexadentat, tác nhân chelat hoá dựa vào phosphonat, tác nhân chelat hoá vòng lớn, các tác nhân chelat hoá bao gồm phối tử terephthalamit vòng lớn, tác nhân chelat hoá hai chức, tác nhân chelat hoá có dẫn xuất fusarinin C và fusarinin C, triaxetylfularinin C (TAFC), ferioxamin E (FOX E), ferioxamin B (FOX B), ferichrom A (FCHA), và tương tự.

Theo một số phương án, gốc chelat hoá được liên kết cộng hoá trị với protein gắn kết PD-L1, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, thông qua gốc liên kết, mà gắn kết cộng hoá trị với phần chelat hoá của gốc chelat hoá với protein gắn kết. Theo một số phương án, các gốc liên kết được tạo ra từ phản ứng giữa gốc phản ứng của protein gắn kết PD-L1, ví dụ, xystein hoặc lysin của kháng thể và gốc phản ứng mà được gắn vào tác nhân chelat hoá, bao gồm, ví dụ, nhóm p-isothioxyanatobenyl và các gốc phản ứng được đề xuất theo các phương pháp kết hợp dưới đây. Ngoài ra, các gốc liên kết tùy ý bao gồm các gốc hoá học được sử dụng nhằm mục đích điều chỉnh tính phân cực, tính tan, sự tương tác trong không gian, độ cứng vững và/hoặc chiều dài giữa phần chelat hoá và protein gắn kết PD-L1.

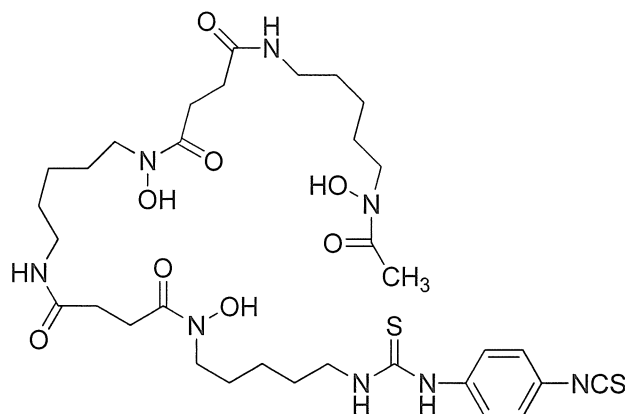
C. Tạo ra thể tiếp hợp kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ

Thể tiếp hợp protein kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ có thể được tạo ra bằng cách (1) cho protein gắn kết PD-L1, ví dụ, kháng thể, phản ứng với phân tử bao gồm tác nhân chelat hoá phát xạ positron và gốc phản ứng ở vị trí kết hợp mong muốn của protein gắn kết PD-L1 và (2) nạp tác nhân phát xạ positron mong muốn.

Các vị trí kết hợp thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lysin và xystein, cả hai trong số chúng có thể, ví dụ, là dạng nguyên thể hoặc được thao tác và có thể, ví dụ, có mặt trên chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể. Các vị trí kết hợp xystein bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vị trí thu được từ sự đột biến, chèn vào hoặc khử liên kết disulfua của kháng thể. Các phương pháp tạo ra kháng thể được thao tác xystein bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp được bộc lộ

trong công bố đơn quốc tế số WO2011/056983. Các phương pháp kết hợp đặc hiệu vị trí cũng có thể được sử dụng để chỉ dẫn phản ứng kết hợp đến vị trí đặc hiệu của kháng thể, đạt được hệ số tỷ lệ mong muốn và/hoặc đạt được tỷ lệ được chất với kháng thể (DAR) mong muốn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết các phương pháp kết hợp như vậy và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp thao tác xystein và enzym và hoá học-enzym, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kết hợp glutamin, kết hợp Q295 và kết hợp qua trung gian transglutaminaza, cũng như các phương pháp được mô tả trong ấn phẩm: *J.Clin.Immunol.*, 36: 100 (2016), nội dung của ấn phẩm này được đưa vào bảo mô tả này bằng cách viện dẫn. Các gốc thích hợp phản ứng ở vị trí kết hợp mong muốn thường cho phép sự kết hợp hữu hiệu và dễ dàng của protein gắn kết PD-L1, ví dụ, kháng thể và tác nhân chelat hoá phát xạ positron. Các gốc phản ứng ở vị trí lysin và xystein bao gồm các nhóm ái lực với điện tử, mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo các khía cạnh nhất định, khi vị trí kết hợp mong muốn là lysin, gốc phản ứng là isothioxyanat, ví dụ, nhóm p-isothioxyanatobenzyl hoặc este phản ứng. Theo các khía cạnh nhất định, khi vị trí kết hợp mong muốn là xystein, gốc phản ứng là maleimit.

Khi tác nhân chelat hoá là desferioxamin (DFO), các gốc phản ứng phù hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm isothioxyantatobenzyl, n-hydroxysuxinimit este, 2,3,5,6 tetraflophenol este, n-suxinimidyl-S-axetylthioaxetat, và các gốc được mô tả trong ấn phẩm: *BioMed Research International*, Vol 2014, Article ID 203601, nội dung của ấn phẩm này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết PD-L1 là kháng thể và phân tử bao gồm tác nhân chelat hoá phát xạ positron và gốc phản ứng ở vị trí kết hợp là p-isothioxyantatobenzyl-desferioxamin (p-SCN-Bn-DFO):



Lượng tác nhân phát xạ positron đạt được bằng cách ủ tác nhân chelat hoá protein gắn kết PD-L1 kết hợp với tác nhân phát xạ positron trong thời gian đủ để cho phép sự hợp tác của tác nhân phát xạ positron với tác nhân chelat hoá, *ví dụ*, bằng cách thực hiện các phương pháp được mô tả trong các ví dụ được đề xuất trong bản mô tả này hoặc phương pháp tương tự.

D. Các phương án minh hoạ thể tiếp hợp

Sáng chế đề xuất thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phối tử 1 chết theo chương trình của người (PD-L1), gốc chelat hoá, và tác nhân phát xạ positron.

Theo một số phương án, gốc chelat hoá bao gồm tác nhân chelat hoá có khả năng tạo ra phức hệ với ^{89}Zr . Theo các phương án nhất định, gốc chelat hoá bao gồm desferioxamin. Theo các phương án nhất định, gốc chelat hoá là p-isothioxyanatobenzyl-desferioxamin.

Theo một số phương án, tác nhân phát xạ positron là ^{89}Zr .

Theo một số phương án, tỷ lệ gốc chelat hoá với kháng thể của thể tiếp hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Theo phương án cụ thể, gốc chelat hoá là p-isothioxyanatobenzyl-desferioxamin và tác nhân phát xạ positron là ^{89}Zr . Theo phương án cụ thể khác, gốc chelat hoá là p-isothioxyanatobenzyl-desferioxamin và tác nhân phát xạ positron là ^{89}Zr , và tỷ lệ gốc chelat hoá với kháng thể của thể tiếp hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất protein gắn kết kháng nguyên mà gắn kết với PD-L1, trong đó protein gắn kết kháng nguyên mà gắn kết PD-L1 được liên kết cộng hoá trị với một hoặc nhiều gốc có công thức sau:



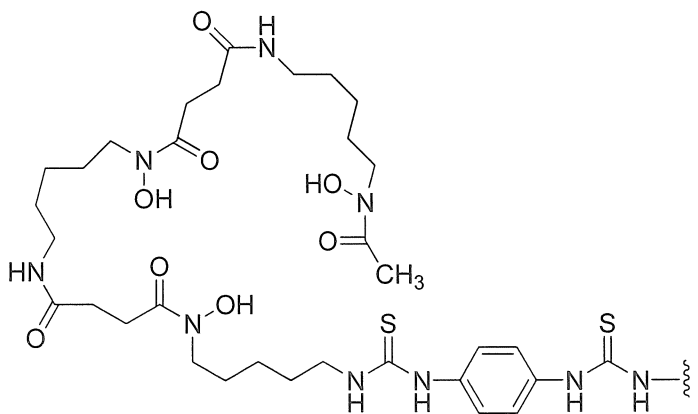
trong đó L là gốc chelat hoá; M là tác nhân phát xạ positron; và z trong mỗi trường hợp độc lập là 0 hoặc 1; và trong đó ít nhất một trong số z là 1. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết kháng nguyên được đánh dấu bằng phóng xạ là hợp chất có công thức (I):



(I)

A là protein mà gắn kết PD-L1; L là gốc chelat hoá; M là tác nhân phát xạ positron; z là 0 hoặc 1; và k là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 30. Theo một số phương án, k là 1.

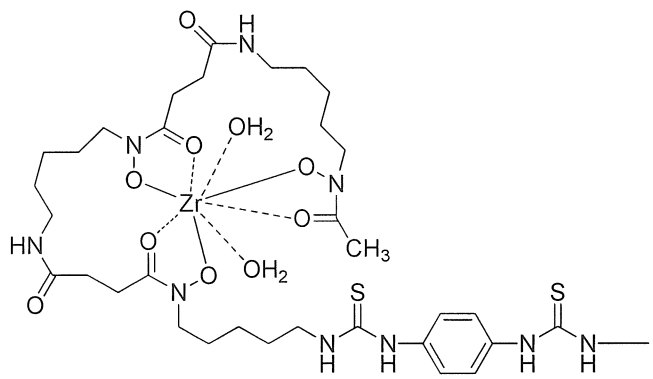
Theo một số phương án, L có cấu trúc:



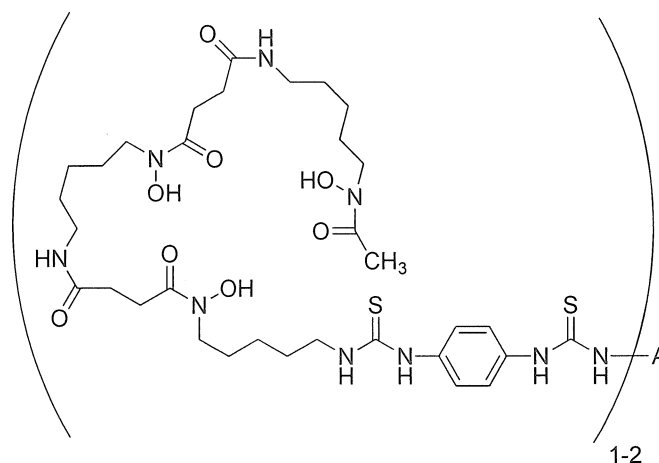
Theo một số phương án, M là ^{89}Zr .

Theo một số phương án, k là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2. Theo một số phương án, k là 1.

Theo một số phương án, -L-M là



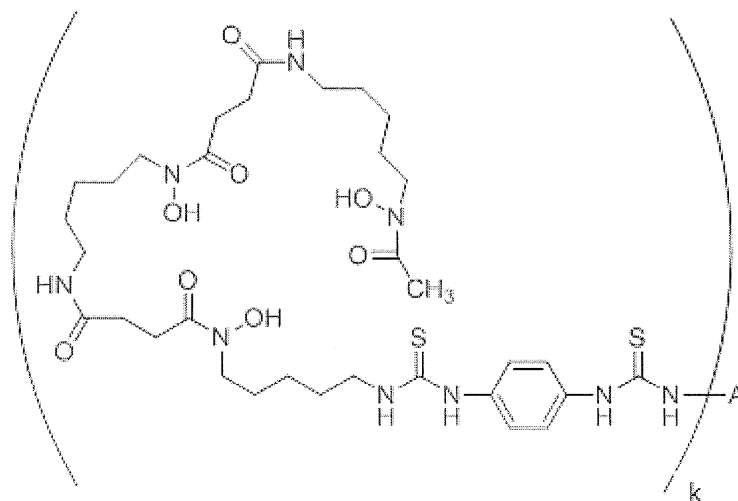
Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tổng hợp thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ bao gồm bước cho hợp chất có công thức (III):



tiếp xúc với ^{89}Zr , trong đó A là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết PD-L1. Theo các phương án nhất định, hợp chất có công thức (III) được tổng hợp bằng cách cho kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết PD-L1, tiếp xúc với p-SCN-Bn-DFO.

Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm của phản ứng giữa hợp chất có công thức (III) với ^{89}Zr .

Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (III):



trong đó A là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết PD-L1 và k là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 30. Theo một số phương án, k là 1 hoặc 2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm thể tiếp hợp có công thức sau:



trong đó A là protein mà gắn kết PD-L1; L là gốc chelat hoá; và k là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 30; trong đó thể tiếp hợp được chelat hoá với tác nhân phát xạ positron với lượng đủ để tạo ra hoạt tính đặc hiệu thích hợp để chụp ảnh PET lâm sàng. Theo một số phương án, lượng tác nhân phát xạ positron được chelat hoá là lượng đủ để tạo ra hoạt tính đặc hiệu 1-3mCi/1-50mg protein gắn kết PD-L1.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết phối tử 1 monome chết theo chương trình của người (PD-L1) với hằng số phân ly cân bằng gắn kết (K_D) nhỏ hơn khoảng 310pM khi đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết PD-L1 monome của người với K_D nhỏ hơn khoảng 180pM trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết PD-L1 dime của người với K_D nhỏ hơn khoảng 15pM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết PD-L1 dime của người với K_D nhỏ hơn khoảng 8pM trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó cạnh tranh gắn kết với PD-L1 của người với kháng thể tham chiếu bao gồm các vùng quyết định bổ sung (CDR) của HCVR, trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự HCVR được liệt kê trong bảng 1; và các CDR của LCVR, trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự LCVR được liệt kê trong bảng 1. Theo một số phương án, kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như được nêu trong bảng 1. Theo một số phương án, kháng thể tham chiếu bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 82/90, 98/106, 146/154, 162/170, 290/274, 306/274, 314/274 và 330/274.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó làm tăng cường sự gắn kết của PD-L1 với một trong số PD-1 hoặc B7-1. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự gắn kết

của PD-L1 với PD-1 và/hoặc B7-1. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó không làm tăng hoặc làm giảm sự kết của PD-L1 với phối tử của nó.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng quyết định bổ sung (CDR) của HCVR, trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 18, 66, 114, 130, 202, 218, 266, 282, 298, 322, và 338; và CDR của LCVR, trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 26, 74, 122, 138, 210, 226, và 274. Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 18/26, 66/74, 114/122, 130/138, 202/210, 218/226, 266/274, 282/274, 298/274, 322/274, và 338/274.

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể đơn dòng của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1 của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự HCVR được liệt kê trong bảng 1.

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể đơn dòng của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1 của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có trình tự LCVR được liệt kê trong bảng 1.

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể đơn dòng của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1 của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự HCVR được liệt kê trong bảng 1; và (b) LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự LCVR được liệt kê trong bảng 1.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba vùng quyết 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 một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332, và 340;

(b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334, và 342;

(c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336, và 344;

(d) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260, và 276;

(e) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262, và 278; và

(f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264, và 280.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 82/90, 98/106, 146/154, 162/170, 290/274, 306/274, 314/274 và 330/274

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm CDR của HCVR, trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 34, 50, 82, 98, 146, 162, 178, 186, 234, 250, 290, 306, 314, và 330; và CDR của LCVR, trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 42, 58, 90, 106, 154, 170, 194, 242, 258, và 274.

E. Quy trình sản xuất quy mô lớn thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1-tác nhân chelat hoá

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất trên quy mô lớn để tạo ra kháng thể kháng PD-L1 được tiếp hợp với tác nhân chelat hoá. Thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1-tác nhân chelat hoá ở dạng thích hợp để đánh dấu bằng phóng xạ.

Quy trình sản xuất hữu ích được đề xuất theo tất cả các khía cạnh về sản xuất, bao gồm việc duy trì môi trường vô trùng, quy trình tiết trùng, duy trì sự ghi chép của tất cả các quy trình và ghi nhận chất lượng sản phẩm, độ tinh khiết, độ bền và sự giống nhau của sản phẩm và các sai lệch bất kỳ của nó.

Theo một số phương án, quy trình sản xuất trên quy mô lớn nhanh hơn nhiều so với quy trình sản xuất nhằm mục đích nghiên cứu và phát triển. Theo một số phương án, quy trình sản xuất trên quy mô lớn có thể diễn ra ít hơn 12 giờ hoặc ít hơn 10 giờ hoặc ít hơn 8 giờ hoặc ít hơn 6 giờ hoặc ít hơn 4 giờ hoặc ít hơn hoặc khoảng 2 giờ.

Theo một số phương án, bước thứ nhất bao gồm việc siêu lọc và lọc qua màng (UFDF), bằng cách sử dụng màng 30-50kDa, kháng thể kháng PD-L1 để loại bỏ các tá dược, các loại cản trở sự tiếp hợp và các muối mà ức chế quá trình tiếp hợp. Các polyme màng điển hình bao gồm polyetesulfon (PES), xenluloza axetat (CA), và xenluloza tái chế (RC). Ở bước này, kháng thể ở dạng dung dịch đậm được trao đổi trong dung dịch đậm có nồng độ ion thấp và không cản trở. Độ pH có thể nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6 hoặc khoảng từ 5 đến 6 hoặc khoảng từ 5,3 đến 5,7, hoặc khoảng 5,5. Các hệ đệm hữu ích được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm hệ đệm bất kỳ thiếu amin bậc một. Các dung dịch đậm điển hình bao gồm dung dịch đậm axetat, phosphat hoặc xitrat. Dung dịch đậm tạo ra độ ổn định protein trong quá trình trước tiếp hợp. Thể tích của quá trình này còn có thể được giảm để cô đặc kháng thể, sau đó được lọc vô trùng.

Theo UFDF trước tiếp hợp, kháng thể đã cô đặc và lọc có thể được chuyển vào hệ đệm cacbonat không chứa amin. Hệ đệm cacbonat có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,6, hoặc từ 9,0 đến 9,6, hoặc từ 9,2 đến 9,4, hoặc từ 9,4 đến 9,6, hoặc độ pH khoảng 9,4.

Tác nhân chelat hoá, ví dụ, DFO, trong dung môi được bổ sung đến nồng độ đích vào trong hệ đệm chứa kháng thể và dung môi khác có thể được bổ sung vào dung dịch đến tỷ lệ phần trăm mong muốn. Tác nhân chelat hoá có thể được bổ sung

vào với lượng mol dư kháng thể, ví dụ tác nhân chelat hoá với kháng thể ở tỷ lệ 3,5-5:1. Tổng thể tích phản ứng có thể lên đến 5L.

Nhiệt độ phản ứng và thời gian phản ứng có liên quan theo tỷ lệ nghịch. Ví dụ, nếu nhiệt độ phản ứng càng cao, thì thời gian phản ứng càng lâu. Nếu nhiệt độ phản ứng càng thấp, thời gian phản ứng càng cao. Theo cách minh hoạ, ở nhiệt độ cao hơn 18°C, phản ứng có thể diễn ra ít hơn khoảng 2 giờ; ở nhiệt độ thấp hơn 18°C, phản ứng có thể diễn ra trong nhiều hơn 2 giờ.

Phản ứng tiếp hợp có thể được kết thúc bằng cách dập tắt, ví dụ bằng cách bổ sung axit axetic.

Theo một số phương án, sự tiếp hợp của kháng thể với deferoxamin được thực hiện để tạo ra thể tiếp hợp DFO-mAb. Theo một số phương án, sự tiếp hợp của kháng thể với p-SCN-Bn-deferoxamin được thực hiện để tạo ra thể tiếp hợp DFO-mAb.

Các dung môi điển hình đối với tác nhân chelat hoá bao gồm DMSO và DMA. Các bước UFDF tiếp theo sử dụng màng, và màng được chọn dựa vào hệ dung môi được sử dụng trong bước tiếp hợp. Ví dụ, DMA hoà tan màng PES, do đó hai dung môi này có thể không được sử dụng trong cùng một hệ dung môi.

Các dung dịch đệm cacbonat không được ưu tiên đối với sự ổn định của thể tiếp hợp trong thời gian lưu trữ lâu dài. Do đó, một khi thể tiếp hợp kháng thể-tác nhân chelat hoá đã được tạo ra, chúng có thể là dung dịch đệm được trao đổi thành dung dịch đệm được chọn theo cách riêng để lưu trữ lâu dài và ổn định. Các dung dịch đệm điển hình bao gồm dung dịch đệm xitrat, axetat, phosphat, arginin và histidin. Bước UFDF khác có thể được thực hiện để loại bỏ các muối dư và tạo ra nồng độ thích hợp, nồng độ tá dược và độ pH của kháng thể đơn dòng đã tiếp hợp thích hợp. Các thể tiếp hợp kháng thể-tác nhân chelat hoá thu được có thể được lọc vô trùng và được lưu trữ dùng cho chế phẩm tiếp theo.

III. Phương pháp sử dụng thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán và điều trị bằng cách sử dụng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện PD-L1 trong

mô, phương pháp này bao gồm bước dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế cho mô; và hiển thị hoá sự biểu hiện của PD-L1 bằng cách chụp cắt lớp phát xạ positron (PET). Theo các phương án nhất định, mô bao gồm tế bào hoặc dòng tế bào. Theo các phương án nhất định, mô có mặt ở đối tượng, trong đó đối tượng là động vật có vú. Theo các phương án nhất định, đối tượng là người. Theo các phương án nhất định, đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm gồm có bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và bệnh viêm. Theo một phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, bệnh nhiễm trùng là bệnh nhiễm vi khuẩn hoặc virus do, ví dụ do virus viêm gan B (HBV), virus viêm gan C (HCV), virus gây suy giảm miễn dịch mắc phải ở người (HIV), và *Mycobacterium tuberculosis* gây ra.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chụp ảnh mô mà biểu hiện PD-L1 bao gồm bước dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế cho mô; và hiển thị hoá sự biểu hiện của PD-L1 bằng cách chụp cắt lớp phát xạ positron (PET). Theo một phương án, mô có trong khối u. Theo một phương án, mô có trong môi trường nuôi cấy tế bào khối u hoặc dòng tế bào khối u. Theo một phương án, mô có trong thương tổn khối u ở đối tượng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp đo sự đáp ứng với liệu pháp điều trị, trong đó sự đáp ứng với liệu pháp điều trị được đo bằng cách đo chứng viêm. Các phương pháp theo khía cạnh này, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị này dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế và hiển thị hoá sự biểu hiện của PD-L1 bằng cách chụp cắt lớp phát xạ positron (PET). Theo các phương án nhất định, chứng viêm có mặt trong khối u ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, sự gia tăng sự biểu hiện của PD-L1 có tương quan với sự gia tăng về chứng viêm trong khối u.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp xác định nếu người bệnh thích hợp đối với liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1, phương pháp này bao gồm bước lựa chọn người bệnh mắc khối u thể rắn, cho dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế và định vị thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ đã dùng trong khối u bằng cách chụp ảnh PET trong đó sự có mặt của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u nhận biết người bệnh phù hợp cho liệu pháp kháng khối u bao

gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp nhận biết ứng viên cho liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1, phương pháp bao gồm bước lựa chọn người bệnh mắc khối u thể rắn, cho dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế, và định vị thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ đã dùng trong khối u bằng cách chụp ảnh PET trong đó sự có mặt của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u nhận biết người bệnh phù hợp cho liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp dự đoán sự đáp ứng của người bệnh đối với liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1, phương pháp bao gồm bước lựa chọn người bệnh mắc khối u thể rắn, xác định nếu khối u dương tính với PD-L1, trong đó sự đáp ứng dương tính của người bệnh được dự đoán nếu khối u dương tính với PD-L1. Theo các phương án nhất định, khối u được xác định dương tính bằng cách cho dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế và định vị thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ đã dùng trong khối u bằng cách chụp ảnh PET trong đó sự có mặt của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u cho biết rằng khối u dương tính với PD-L1.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện khối u dương tính với PD-L1 ở đối tượng. Theo khía cạnh này, phương pháp bao gồm bước lựa chọn đối tượng mắc khối u thể rắn; cho đối tượng này dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế; và xác định sự định vị của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ bằng cách chụp ảnh PET, trong đó sự có mặt của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u cho biết khối u dương tính với PD-L1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “đối tượng cần điều trị” có nghĩa là người hoặc động vật có vú không phải người mà thể hiện một hoặc nhiều triệu chứng hoặc chỉ định bệnh ung thư và/hoặc đã được chẩn đoán mắc bệnh ung thư, bao gồm khối u thể rắn và cần điều trị này. Theo nhiều phương án, thuật ngữ “đối tượng” có thể được sử dụng thay thế cho nhau với thuật ngữ “người bệnh”. Ví dụ, đối tượng

người có thể được chẩn đoán mắc khối u nguyên phát hoặc di căn và/hoặc với một hoặc nhiều triệu chứng hoặc chỉ định bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giảm cân không giải thích được, tình trạng yếu tổng thể, mệt mỏi kéo dài, chán ăn, sốt, đổ mồ hôi về đêm, đau xương, khó thở, bụng sưng, đau ngực/tức ngực, lá lách to và tăng nồng độ chỉ thị sinh học có liên quan đến bệnh ung thư (ví dụ, CA125). Cụm từ này bao gồm đối tượng mắc khối u nguyên phát hoặc thiết lập. Theo các phương án cụ thể, cụm từ này bao gồm đối tượng là người mà có và/hoặc cần điều trị đối với khối u thể rắn, ví dụ, ung thư ruột kết, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư da, ung thư gan, ung thư xương, ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư tuyến tụy, ung thư đầu và cổ và ung thư não. Thuật ngữ này bao gồm đối tượng mắc khối u nguyên phát hoặc di căn (ác tính tiến triển). Theo các phương án nhất định, cụm từ “đối tượng cần điều trị” bao gồm người bệnh mắc khối u thể rắn mà kháng hoặc khó hoặc được kiểm soát không phù hợp bởi liệu pháp theo giải pháp kỹ thuật đã biết (ví dụ, điều trị bằng tác nhân kháng ung thư). Ví dụ, cụm từ này bao gồm đối tượng mà đã được điều trị bằng một hoặc nhiều loại liệu pháp theo giải pháp kỹ thuật đã biết như điều trị bằng liệu pháp hoá trị liệu (ví dụ, carboplatin hoặc docetaxel). Theo các phương án nhất định, cụm từ “đối tượng cần điều trị” bao gồm người bệnh mắc khối u thể rắn mà đã được điều trị bằng một hoặc nhiều loại liệu pháp nhưng sau đó đã bị tái phát hoặc bị di căn. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ này bao gồm đối tượng mắc bệnh viêm hoặc rối loạn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư, viêm khớp dạng thấp, xơ vữa động mạch, viêm nha chu, sốt mùa hè, bệnh tim, bệnh động mạch vành, bệnh nhiễm trùng, viêm phế quản, viêm da, viêm màng não, bệnh hen, bệnh lao, viêm loét ruột kết, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột, viêm gan, viêm xoang, bệnh vẩy nến, chứng xơ hoá, bệnh luput, bệnh viêm mạch, viêm cột sống dính khớp, bệnh Graves, bệnh Celiac, đau cơ xương và thải loại phân ghép.

Theo các phương án nhất định, phương pháp theo sáng chế được sử dụng ở đối tượng mắc khối u thể rắn. Thuật ngữ “khối u”, “bệnh ung thư” và “khối u ác tính” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khối u thể rắn” dùng để chỉ khối lượng mô bất thường mà thường không chứa khu vực u nang hoặc dịch lỏng. Khối u thể rắn có thể là lành tính (không ung thư) hoặc ác tính (ung thư). Đối với mục đích của sáng chế, thuật ngữ “khối u thể rắn” có nghĩa là khối u thể rắn ác tính. Thuật ngữ này bao gồm các loại khối u thể rắn

khác nhau được đặt tên theo loại tế bào mà tạo ra chúng, ví dụ ung thư mô liên kết, ung thư biểu mô và u lympho. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “khối u thể rắn” bao gồm bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư não, ung thư cổ tử cung, ung thư bàng quang, ung thư hậu môn, ung thư tử cung, ung thư ruột kết, ung thư gan, ung thư tuyến tụy, ung thư phổi, ung thư nội mạc tử cung, ung thư xương, ung thư tinh hoàn, ung thư da, ung thư thận, ung thư dạ dày, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến nước bọt và ung thư tuỷ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị khối u ở đối tượng. Theo khía cạnh này, phương pháp bao gồm bước lựa chọn đối tượng mắc khối u thể rắn; xác định rằng khối u dương tính với PD-L1; và cho dùng một hoặc nhiều liều chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1. Theo các phương án nhất định, khối u được xác định dương tính với PD-L1 bằng cách cho đối tượng dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế; và hiển thị hoá thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u bằng các chụp ảnh PET, trong đó sự có mặt của thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ trong khối u cho biết rằng khối u dương tính với PD-L1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều trị”, “sự điều trị” hoặc thuật ngữ tương tự, có nghĩa là làm giảm triệu chứng, loại trừ nguyên nhân gây ra triệu chứng trên cơ sở tạm thời hoặc lâu dài, làm trễ hoặc ức chế sự phát triển khối u, làm giảm lượng tế bào khối u hoặc khối lượng khối u, để thúc đẩy sự hồi quy khối u, khiến cho co rút khối u, gây chết hoại và/hoặc biến mất khối u, ngăn ngừa sự tái phát khối u, ngăn ngừa hoặc ức chế di căn, ức chế sự phát triển khối u di căn và/hoặc làm tăng thời gian sống của đối tượng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp giám sát hiệu quả của liệu pháp kháng khối u ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước lựa chọn đối tượng mắc khối u thể rắn trong đó đối tượng cần được điều trị bằng liệu pháp kháng khối u; cho đối tượng dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế; chụp ảnh vị trí của thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ đã dùng trong khối u bằng cách chụp ảnh PET; và xác định sự phát triển của khối u, trong đó việc giảm từ đường cơ sở trong tín hiệu được đánh dấu bằng phóng xạ cho biết sự hồi quy khối u và hiệu quả của liệu pháp kháng khối u. Theo các phương án nhất định, liệu

pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1).

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp đánh giá sự thay đổi về trạng thái viêm của khối u, phương pháp này bao gồm bước lựa chọn đối tượng mắc khối u thể rắn trong đó đối tượng cần được điều trị bằng liệu pháp kháng khối u; cho đối tượng dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo sáng chế; và chụp ảnh vị trí của thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ đã dùng trong khối u bằng cách chụp ảnh PET, trong đó sự gia tăng từ đường cơ sở trong tín hiệu được đánh dấu bằng phóng xạ cho biết sự gia tăng về chứng viêm và hiệu quả của liệu pháp kháng khối u. Theo các phương án nhất định, liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đường cơ sở”, đối với sự biểu hiện PD-L1 trong khối u, có nghĩa là giá trị theo số hấp thụ thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ đối với đối tượng trước hoặc tại thời điểm dùng liệu pháp kháng khối u. Sự hấp thụ thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ ấn phẩm: Oosting et al 2015, J. Nucl. Med. 56: 63-69). Theo các phương án nhất định, liệu pháp kháng khối u bao gồm chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1.

Để xác định xem liệu có sự hồi quy khối u hay không, sự hấp thụ thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ được xác định ở đường cơ sở và ở một hoặc nhiều thời điểm sau khi dùng chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1). Ví dụ, sự hấp thụ thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ đã dùng (ví dụ, thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ) có thể được đo ở ngày 2, ngày 3, ngày 4, ngày 5, ngày 6, ngày 7, ngày 8, ngày 9, ngày 10, ngày 11, ngày 12, ngày 14, ngày 15, ngày 22, ngày 25, ngày 29, ngày 36, ngày 43, ngày 50, ngày 57, ngày 64, ngày 71, ngày 85; hoặc cuối tuần 1, tuần 2, tuần 3, tuần 4, tuần 5, tuần 6, tuần 7, tuần 8, tuần 9, tuần 10, tuần 11, tuần 12, tuần 13, tuần 14, tuần 15, tuần 16, tuần 17, tuần 18, tuần 19, tuần 20, tuần 21, tuần 22, tuần 23, tuần 24, hoặc lâu hơn, sau khi điều trị ban đầu bằng chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1). Sự khác nhau giữa giá trị hấp thụ tại thời điểm cụ thể sau khi bắt đầu điều trị và giá trị hấp thụ ở đường cơ sở được sử dụng để thiết lập xem liệu có sự khác nhau về lượng mô khối u (sự hồi quy hoặc tiến triển khối u) hay không. Ví

dự, sự giảm từ đường cơ sở về sự hấp thụ khi điều trị bằng ít nhất một liều chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 có nghĩa là hồi quy khối u và cho thấy hiệu quả của liệu pháp kháng khối u.

Theo các phương án nhất định, thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ được dùng trong tĩnh mạch hoặc dưới da cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ được dùng trong khối u. Khi dùng, thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ được định vị trong khối u. Chụp ảnh thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ được định vị bằng cách chụp ảnh PET và đo sự hấp thụ thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ bởi khối u bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Theo các phương án nhất định, việc chụp ảnh được thực hiện 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 ngày sau khi dùng thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ. Theo các phương án nhất định, việc chụp ảnh được thực hiện vào cùng một ngày khi dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-L1 bao gồm các CDR của HCVR, trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 34, 50, 82, 98, 146, 162, 178, 186, 234, 250, 290, 306, 314, và 330; và các CDR của LCVR, trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 42, 58, 90, 106, 154, 170, 194, 242, 258, và 274.

Theo các phương án nhất định, chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với PD-1. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 được chọn từ nhóm gồm có nivolumab, pembrolizumab và REGN2810. Theo các phương án nhất định khác, chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với PD-L1. Theo một phương án, kháng thể kháng PD-L1 là atezolizumab. Theo một phương án, kháng thể kháng PD-L1 bao gồm HCVR của SEQ ID NO: 82 và LCVR của SEQ ID NO: 90.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương án cụ thể của sáng chế được minh họa bởi các ví dụ không hạn

chế sau.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể người kháng PD-L1

Các kháng thể kháng PD-L1 của người, bao gồm các kháng thể được liệt kê trong bảng 1, được tạo ra và được mô tả đặc điểm như được mô tả trong công bố patent Mỹ số US 2015-0203580 A1, nội dung của patent Mỹ này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Tóm lại, các kháng thể người kháng PD-L1 được tạo ra bằng cách sử dụng mảnh PD-L1 mà nằm trong khoảng từ các axit amin 19 đến 239 của PD-L1 (số truy cập Genbank NP_054862.1). Tác nhân gây miễn dịch được dùng trực tiếp, với tá được để kích thích đáp ứng miễn dịch, cho chuột VELOCIMMUNE® bao gồm ADN mã hoá vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa. Sự đáp ứng miễn dịch kháng thể được giám sát bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu PD-L1. Khi đạt được đáp ứng miễn dịch mong muốn, thu gom tế bào lá lách và được dung hợp với tế bào u tuỷ chuột để duy trì khả năng sống của chúng và tạo ra dòng tế bào lai. Sàng lọc dòng tế bào lai và lựa chọn để nhận biết các dòng tế bào mà tạo ra kháng thể đặc hiệu PD-L1. Bằng cách sử dụng kỹ thuật này và tác nhân gây miễn dịch được mô tả trên đây, thu được vài kháng thể kháng PD-L1 (nghĩa là, kháng thể có miền biến đổi của người và miền hằng định của chuột); các kháng thể làm ví dụ được tạo ra theo cách này được ký hiệu là H2M8306N, H2M8307N, H2M8309N, H2M8310N, H2M8312N, H2M8314N, H2M8316N, H2M8317N, H2M8321N, H2M8323N, H2M8718N, H2M8718N2, và H2M8719N.

Kháng thể kháng PD-L1 cũng được phân lập trực tiếp từ tế bào B dương tính kháng nguyên mà không dung hợp với tế bào u tuỷ, như được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số U.S. 2007/0280945A1, nội dung của đơn yêu cầu cấp patent Mỹ này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Bằng cách sử dụng phương pháp này, thu được vài kháng thể kháng PD-L1 nguyên vẹn của người (nghĩa là, kháng thể có 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: H1H9323P, H1H9327P, H1H9329P, H1H9336P, H1H9344P2, H1H9345P2, H1H9351P2, H1H9354P2, H1H9364P2, H1H9373P2, H1H9382P2, H1H9387P2, và H1H9396P2.

Ví dụ 2: Sự tiếp hợp của kháng thể kháng PD-L1 H4H8314N với p-SCN-Bn-DFO

Để cải biến kháng thể kháng PD-L1 ban đầu, H4H8314N, và kháng thể đối

chứng lớp kháng thể phù hợp đối với các nghiên cứu ImmunoPET với việc đánh dấu bằng phóng xạ, tác nhân chelat hoá, p-SCN-bn-Deferoxamin (DFO; Macrocylics, Cat #: B-705), được gắn vào kháng thể.

Để cải biến, H4H8314N trước tiên là dung dịch đậm được trao đổi vào trong PBS, độ pH=7,2 từ dung dịch đậm histidin nhờ thẩm tách ở 4°C qua đệm (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 10k MWCO; ThermoScientific) tiếp theo dung dịch đậm được trao đổi lại một lần nữa bằng cách sử dụng cột PD-10 (GE Healthcare, Cat. #: 17-0851-01) vào trong dung dịch đậm gồm có 50mM dung dịch đệm cacbonat, 150mM NaCl, độ pH=9,0 (dung dịch đậm tiếp hợp). Để xác định nồng độ sau khi trao đổi dung dịch đậm, các mẫu được đo trên quang phổ kế Nanodrop 2000 UV/VIS (Thermo Scientific) bằng cách sử dụng trình tự MacVector dựa vào hệ số suy giảm 1,46g/L (xem bảng 2). Trong ống 15mL polypropylen, thêm 773,9 uL H4H8314N (12,5mg) vào 1676,1 uL dung dịch đậm tiếp hợp. Trong lọ riêng biệt, thêm 29,3uL DMSO vào 20,7uL DFO. Trong gia số một phần tư, thêm dung dịch DFO vào dung dịch H1H8314N, mỗi lần được trộn nhẹ nhàng bằng pipet lên và xuống. Dung dịch cuối cùng là 5mg/mL H4H8314N trong dung dịch đậm tiếp hợp, 2% DMSO với lượng dư mol gấp 6 lần DFO. Cho phép ủ dung dịch này trong bể nước 37°C mà không khuấy thêm.

Sau 30 phút ở 37°C, chuyển nhanh dung dịch qua cột khử muối PD-10 (GE Healthcare, Cat. #: 17-0851-01), được làm cân bằng trước bằng dung dịch đậm chứa 250mM NaAcO ở độ pH=5,4 (dung dịch đậm bào chế). Lọc vô trùng dung dịch cuối cùng thông qua bộ lọc ống tiêm (bộ lọc ống tiêm Acrodisc 13mm, Pall Corporation, Cat #: 4602). Tiếp theo, đo nồng độ và tỷ lệ của DFO với kháng thể (DAR) bằng quang phổ UV/VIS. Để đo sự hấp thụ, kháng thể tiếp hợp DFO được đo dựa vào dung dịch đậm bào chế ở 252nm (A₂₅₂), 280nm (A₂₈₀) và 600nm (A₆₀₀). Để tính toán, hiệu chỉnh nền ở mỗi giá trị hấp thụ bằng cách sử dụng phương trình:

$$A'_{\lambda} = A_{\lambda} - A_{600}$$

Thế tiếp hợp kháng thể được thử nghiệm đối với sự kết tụ bằng cách sử dụng phép sắc ký SEC, với 25ug mẫu được bơm lên cột Superdex 200 (GE Healthcare, Cat. No. 17-5175-01) được kiểm tra ở 280nm với pha động PBS (0,75mL/phút). Đánh giá tính nguyên vẹn kháng thể bằng SDS-PAGE 4-20% Tris/Gly pre-cast gel (Novex) với

2ug mẫu được tải. Gel được thể hiện trên Fig.1. Nồng độ kháng thể, nồng độ thể tiếp hợp và DAR được tính toán bằng cách sử dụng phương trình dưới đây:

Tính toán nồng độ kháng thể

$$\text{Nồng độ mAb (mg/mL)} = \frac{A'_{280}}{\epsilon_{280}}$$

Tính toán nồng độ thể tiếp hợp

$$\text{Nồng độ thể tiếp hợp (mg/mL)} = \frac{A'_{252} - 1.53A'_{280}}{\epsilon_{252} - 1.53\epsilon_{280}}$$

Tính toán DAR

$$\text{DAR} = \frac{\epsilon_{252}A'_{280} - \epsilon_{280}A'_{252}}{18800A'_{252} - 28700A'_{280}}$$

Bảng 2: Hệ số tắt theo mol và trọng lượng phân tử

Kháng thể	MW (g mol ⁻¹)	ϵ_{280} (L g ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ_{252} (L g ⁻¹ cm ⁻¹)
H4H8314N	144984	1,46	0,553

Bảng 3: UV DAR, tỷ lệ phần trăm kết tụ và nồng độ sau khi gắn DFO

Kháng thể	UV DAR	Nồng độ (mg/mL)	% kết tụ
H4H8314N	1,2	3,34	< 1%

Ví dụ 3: Chelat hoá ⁸⁹Zr của kháng thể đơn dòng tiếp hợp DFO

Để sử dụng trong nghiên cứu ImmunoPET in vivo, kháng thể kháng PD-L1 tiếp hợp DFO, H4H8314N, và kháng thể đối chứng lớp kháng thể tiếp hợp DFO được đánh dấu bằng phóng xạ với ⁸⁹Zr.

Trước tiên, cho kháng thể tiếp hợp DFO (250 hoặc 750ug) vào 1,25mg/mL

trong 1M HEPES, độ pH=7,2. Công thức của dung dịch tiếp hợp DFO-Ab đối với mỗi nghiên cứu được liệt kê trong bảng 4. Theo cách riêng biệt, dung dịch ^{89}Zr được tạo ra bằng cách sử dụng công thức đối với mỗi nghiên cứu tương ứng được thể hiện trong bảng 5. Dung dịch gốc ^{89}Zr -axit oxalic thu được từ PerkinElmer hoặc ảnh chụp 3D. Nếu nồng độ hoạt tính phóng xạ của dung dịch gốc thấp (xem bảng 5), bước làm trung hoà được thực hiện với 1M borat, độ pH=9,0. Hoạt tính phóng xạ cuối cùng trước tiên được xác nhận bằng cách sử dụng bộ định cỡ liều Capintec CRC-25R (Capintec #520), tiếp theo kết hợp ngay với dung dịch tiếp hợp DFO-Ab, trộn nhẹ nhàng (bằng pipet lên và xuống) và tiếp theo ủ trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng.

Sau khi ủ, lấy mẫu nhỏ của mỗi hỗn hợp phản ứng được đối với iTLC (sắc ký lỏng lớp mỏng tức thời) để xác định hiệu suất phản ứng đánh dấu bằng phóng xạ và chuyển hỗn hợp phản ứng còn lại vào cột đã cân bằng trước PD-10 (Vendor) với 250mM natri axetat ở độ pH=5,4 để khử muối theo trọng lực. Mỗi cột PD-10 không chứa nhiều hơn 1,2mL hỗn hợp phản ứng (theo cách khác, nhiều cột được sử dụng). Sau khi hỗn hợp phản ứng được nạp lên cột, thêm 1,6mL natri axetat 250mM ở độ pH=5,4 (dung dịch đệm bào chế) vào; loại bỏ dòng chảy. Thêm tiếp 1,8mL dung dịch đệm bào chế vào cột và thu gom dung dịch giải hấp từ mỗi cột. Tiếp theo, phân tích khoảng 500uL mỗi dung dịch bằng cách sử dụng quang phổ kế Nanodrop (ThermoScientific). Nồng độ Ab cuối cùng được tính toán bằng cách sử dụng hệ số tắt gần đúng và hấp thụ ở 280nm bằng cách sử dụng phương trình:

Nồng độ theo mg/mL = Hấp thụ ở 280nm ÷ Hệ số tắt ở 280nm (xem bảng 6)

Khối lượng cuối cùng được đo theo số gam được ghi chép trong bảng 4. Tiếp theo, đo hoạt tính phóng xạ bằng cách sử dụng bộ định cỡ liều và được ghi chép trong bảng 5. Tiếp theo, phân tích vật liệu cuối cùng cùng với vật liệu trước khi xử lý cột PD-10 bằng iTLC. Đối với thử nghiệm này, thêm 1uL mỗi dung dịch vào giấy sắc ký vi sợi thuỷ tinh iTLC-SG được tẩm silica gel (Agilent Technologies, Cat # SG10001), nhuộm trong khoang TLC với 20mM dung dịch đệm axit xitric. Vật liệu cuối cùng cũng được phân tích bằng cách sử dụng SEC-HPLC với UV 280 và máy đo đồng vị phóng xạ được nối tiếp (Agilent 1260 với Lablogic Radio-TLC/HPLC Detector, SCAN-RAM) bằng cách sử dụng cột Superdex 200 với pha động PBS ở tốc độ dòng 0,75mL/phút. Sử dụng chất đánh dấu phóng xạ để xác định độ tinh khiết của hợp chất hoá học phóng xạ bằng cách so sánh sự tích hợp của đỉnh protein (khoảng từ 10 đến 16

phút) và đỉnh ^{89}Zr tự do (khoảng 25 phút). Xác định độ tinh khiết monome bằng cách so sánh sự tích hợp của đỉnh oligome (từ 10 đến 15 phút) với monome (khoảng 16 phút).

Hoạt tính riêng và lượng thu hồi protein (%) của mỗi thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ được xác định bằng cách sử dụng phương trình sau:

a. Khối lượng thể tiếp hợp tính theo mg = nồng độ tính theo mg/mL x khối lượng dung dịch tính theo gam

b. Hoạt tính riêng tính theo mCi/mg = hoạt tính của lọ nhỏ tính theo mCi ÷ khối lượng thể tiếp hợp tính theo mg

c. Lượng thu hồi protein = khối lượng thể tiếp hợp ban đầu (mg) ÷ Khối lượng của thể tiếp hợp tính theo mg

Cuối cùng, vẽ bên ngoài được lưu ý và được ghi chép trong bảng 7. Cả chất đánh dấu UV280 và iTLC được thực hiện trên sản phẩm tinh khiết.

Các kết quả được hợp nhất trong bảng 7. Biểu đồ sắc ký phóng xạ-SEC-HPLC được thể hiện trên các hình vẽ Fig.2 đến Fig.4. Một ví dụ về biểu đồ sắc ký UV280 HPLC SEC và phóng xạ-iTLC được thể hiện trên Fig.5 để đánh dấu bằng phóng xạ ^{89}Zr , nghiên cứu 1. Biểu đồ sắc ký UV280-HPLC SEC xác nhận sản phẩm monome ở mức cao (99%). Xử lý chất đánh dấu phóng xạ-iTLC bằng hàm tuyến tính nhị thức 7 điểm. Nguồn gốc và bề mặt dung môi lần lượt là khoảng 16 và 100mm. Quan sát ^{89}Zr không phát hiện được ngoài 22mm và xác nhận độ tinh khiết của chất hoá học phóng xạ được xác định bởi phóng xạ-SEC-HPLC SEC trên Fig.2B.

Bảng 4. Chế phẩm thể tiếp hợp DFO-kháng thể để đánh dấu bằng phóng xạ

Đánh dấu bằng phóng xạ #	Nghiên cứu #	Lô đánh dấu bằng phóng xạ	Nồng độ (mg/mL)	DA R*	Khối lượng thể tiếp hợp (mg)	Tổng thể tích (uL)	Nồng độ cuối cùng (mg/mL)
1	1	Lớp kháng thể-DFO- ^{89}Zr	3,7	1,6	250	200	1,25
2	1	H4H8314N-DFO- ^{89}Zr	3,34	1,2	250	200	1,25

3	2	H4H8314N-DFO- ⁸⁹ Zr	3,34	1,2	750	600	1,25
4	3	Lớp kháng thể - DFO- ⁸⁹ Zr	3,7	1,6	250	200	1,25
5	3	H4H8314N-DFO- ⁸⁹ Zr	3,34	1,2	250	200	1,25

* DAR được xác định theo tỷ lệ của DFO với kháng thể

Bảng 5. Dung dịch phản ứng ⁸⁹Zr để đánh dấu bằng phóng xạ

Đánh dấu bằng phóng xạ	Nghiên cứu #	Lô đánh dấu bằng phóng xạ	⁸⁹ Zr-oxalat (uL)	1M axit oxalic bổ sung (uL)	1M borat, độ pH=9,0 bổ sung (uL)	1M HEPES, độ pH=7,2 (uL)	Thể tích cuối cùng (uL)	Hoạt tính cuối cùng (uCi)	Hoạt tính riêng (uCi/uL)
1	1	Lớp kháng thể - DFO- ⁸⁹ Zr	50	50	400	500	1000	1009	1,01
2	1	H4H8314N-DFO- ⁸⁹ Zr	50	50	400	500	1000	1000	1
3	2	H4H8314N-DFO- ⁸⁹ Zr	150	150	1200	1500	3000	3070	1,02
4	3	Lớp kháng thể - DFO- ⁸⁹ Zr	~1	0	0	1000	1000	1680	1,68
5	3	H4H831	~1	0	0	1000	1000	1640	1,64

		4N-DFO- ⁸⁹ Zr							
--	--	--------------------------	--	--	--	--	--	--	--

Bảng 6: Hệ số tắt đối với lô thể tiếp hợp

Lô đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ	ϵ_{280} (AU ml mg ⁻¹ cm ⁻¹)
Lớp kháng thể-DFO- ⁸⁹ Zr	1,71
H4H8314N-DFO- ⁸⁹ Zr	1,61

Bảng 7. Bảng tổng kết của các thể tiếp hợp DFO-Ab được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr để chụp ảnh in vivo và nghiên cứu sự phân bố sinh học

Đánh dấu bằng phóng xạ	Nghiên cứu #	Lô thể tiếp hợp	Vẻ bên ngoài	Độ tinh khiết của chất hoá học phóng xạ* (%)	Độ tinh khiết mono me* (%)	Lượng thu hồi protein (%)	Nồng độ (mg/mL)	Hoạt tính riêng (mCi/mg)
1	1	Lớp kháng thể-DFO- ⁸⁹ Zr	Trong sạch	>99%	>95%	60%	0,106	3,35
2	1	H4H8341 N-DFO- ⁸⁹ Zr	Trong sạch	>99%	>95%	63%	0,121	2,75
3	2	H4H8341 N-DFO- ⁸⁹ Zr	Trong sạch	>99%	>95%	62%	0,134	3,58

4	3	Lớp kháng thể -DFO- ⁸⁹ Zr	Trong sạch	>99%	>95%	66%	0,074	5,38
5	3	H4H8341 N-DFO- ⁸⁹ Zr	Trong sạch	>99%	>95%	74%	0,084	5,13

* bởi phóng xạ-SEC-HPLC

Ví dụ 4: Hoạt tính miễn dịch

Hoạt tính miễn dịch (IR) của kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ và kháng thể của lớp kháng thể đối chứng được đo như sau. Đối với nghiên cứu ban đầu, tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} được sử dụng và tiếp theo tế bào LOX-IMVI (xem phần mô tả chi tiết của các dòng tế bào trong ví dụ 5) cũng được sử dụng sau đó. Trong các thử nghiệm này, thêm 20ng kháng thể được đánh dấu ⁸⁹Zr tương ứng vào 15 x 10⁶ tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} hoặc 30 x 10⁶ tế bào LOX-IMVI với thể tích cuối cùng 1mL. Ủ các mẫu trong 45 phút mà không cần phải trộn liên tục trước khi trải qua 3 lần rửa bằng môi trường để loại bỏ kháng thể không gắn kết bất kỳ. Tiếp theo, đếm hoạt tính phóng xạ của phần cặn tế bào thử nghiệm trong thiết bị đếm gamma tự động (Wizard 2470, Perkin Elmer) dựa trên 2 tiêu chuẩn tham chiếu chứa cùng 20ng kháng thể được đánh dấu ⁸⁹Zr. Tỷ lệ phần trăm phản ứng miễn dịch được xác định đối với các mẫu bằng cách sử dụng giá trị trung bình tiêu chuẩn khi đo tổng hoạt tính.

Như nhìn thấy được trong bảng 8, kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu ⁸⁹Zr vẫn có khả năng phản ứng miễn dịch sau khi tiếp hợp và đánh dấu bằng phóng xạ, với %IR nằm trong khoảng từ 88 đến 98% qua toàn bộ các phản ứng. Tính đặc hiệu gắn kết có mặt trong các kháng thể đối chứng có %IR cơ bản nhỏ hơn 1%.

Bảng 8: Khả năng phản ứng miễn dịch của thể tiếp hợp DFO được chelat hoá ⁸⁹Zr

Nghiên cứu	Nghiên cứu 1	Nghiên cứu 2	Nghiên cứu 3	
Dòng tế bào	MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-	MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-	MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-	LOX-IMVI

	L1 ^{Tg}		L1 ^{Tg}		L1 ^{Tg}			
Kháng thể	Kháng PD-L1 ⁸⁹ Zr	⁸⁹ Zr-đối chứng	Kháng PD-L1 ⁸⁹ Zr	⁸⁹ Zr-đối chứng	Kháng PD-L1 ⁸⁹ Zr	⁸⁹ Zr-đối chứng	Kháng PD-L1 ⁸⁹ Zr	⁸⁹ Zr-đối chứng
Hoạt tính phân cận tế bào	4048,4	29,6	8311,9	na	6262,4	68	5587,54	65,4
Hoạt tính tiêu chuẩn trung bình	4536,5	6432,4	8567,2	na	6386,6	9544,8	6386,6	9544,8
Tỷ lệ phân trăm IR	89,2	0,5	97,0	na	98,1	0,7	87,5	0,7

Ví dụ 5: Đặc điểm *In vitro* và *ex vivo* của PD-L1 người biểu hiện trên dòng tế bào khối u

Vài dòng tế bào khối u được nghiên cứu để đánh giá mức độ biểu hiện của PD-L1 của người, nhằm mục đích phát hiện PD-L1 của người được biểu hiện nội sinh bởi khối u *in vivo* ở chuột đực trụi lông NCr (Taconic, Hudson NY) hoặc ở chuột mà được thao tác di truyền thành đồng hợp tử để biểu hiện miền ngoại bào của PD-L1 của người thay cho miền ngoại bào của PD-L1 của chuột (PD-L1 HumIn mice) trên chủng 129 75% C57/Bl6 / 25% bằng cách sử dụng kỹ thuật VelociGene® (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659; công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US2016/0157469).

Các dòng tế bào được sử dụng trong các nghiên cứu này bao gồm: 1) dòng tế bào ung thư biểu mô ruột kết của chuột MC38 (thu được từ NCI ở Frederick, MD, Laboratory of Tumor Immunology and Biology), mà đã được thao tác di truyền theo nhóm để tách PD-L1 ra khỏi chuột, nhưng biểu hiện quá mức PD-L1 nguyên vẹn của

người và ovalbumin trứng gà nguyên vẹn được dung hợp với eGFP, do đó trong bản mô tả này được gọi là MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1⁻/hPD-L1^{Tg}; 2) vài dòng tế bào khối u của người: dòng tế bào khối u ác tính của người LOX-IMVI (dòng dương tính với PD-L1 nội sinh, thu được từ NCI ở Frederick, MD, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, Tumor Repository), dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 (dòng dương tính với PD-L1 nội sinh) và SK-Br-3 (dòng tế bào âm tính với PD-L1) (cả hai dòng tế bào thu được từ ATCC). Trong một số trường hợp, PD-L1 người được đánh giá trực tiếp mà không có sự cảm ứng bất kỳ in vitro; trong một số trường hợp, sự biểu hiện PD-L1 người được đánh giá với phép điều trị IFN γ chuột hoặc người qua đệm (100ng/ml) (thu được từ Peprotech); trong một số trường hợp, PD-L1 người được đánh giá ex vivo đối với tế bào khối u được phân ly về mặt enzym được chiết suất từ chuột trụi lông mang khối u hoặc chuột được làm giống người. Tất cả việc nhuộm bề mặt PD-L1 của người được thực hiện theo thủ tục tiêu chuẩn. Tóm lại, tế bào khối u được rửa bằng PBS một lần, rửa bằng dung dịch đệm nhuộm trong đá lạnh một lần, nhuộm bằng flocrom có bán sẵn trên thị trường được tiếp hợp trực tiếp kháng thể kháng PD-L1 của người (eBioscience, thể đơn dòng MIH1) trong dung dịch đệm nhuộm trong 30 phút trên nước đá trong bóng tối và tiếp theo rửa bằng 2mL PBS một lần nữa. Thuộc nhuộm cố định eFluor506 cũng được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất (eBioscience, Cat #17-5983). Thu được các mẫu trên BD FACSCanto IITM IVD10 được trang bị DIVA v8. Phân tích dữ liệu hơn nữa bằng FlowJo v10.0.6 hoặc thiết bị nêu trên.

Sự biểu hiện PD-L1 bởi tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1⁻/hPD-L1^{Tg} trước khi cấy ghép và vài ngày sau cấy ghép ở chuột trụi lông được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9: Tỷ lệ phần trăm của tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1⁻/hPD-L1^{Tg} dương tính với PD-L1 của người trước khi cấy ghép và 7 ngày sau cấy ghép ở chuột trụi lông

	Nhuộm lớp kháng thể	Nhuộm hPD-L1
Trước cấy ghép	0,6%	94,7%
Sau cấy ghép	1,09%	74,0%

Trước khi cấy ghép, phần lớn tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} dương tính với PD-L1 của người, so với nhuộm lớp kháng thể đối chứng. Vài ngày sau cấy ghép ở chuột trụi lông và khi xử lý bằng enzyme và cơ học đối với sự phân ly khối u, khoảng 70% tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} vẫn dương tính với PD-L1 của người.

Sự biểu hiện PD-L1 bởi tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} trước cấy ghép và mười bốn ngày sau cấy ghép ở chuột được làm giống người PD-L1 được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10: Tỷ lệ phần trăm của tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} dương tính với PD-L1 của người trước cấy ghép và 14 ngày sau cấy ghép ở chuột được làm giống người PD-L1

	Nhuộm lớp kháng thể	Nhuộm hPD-L1
Trước cấy ghép	0,2%	92,5%
Sau cấy ghép	3,6	46,2%

Trước khi cấy ghép, phần lớn tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} dương tính với PD-L1 của người, so với nhuộm lớp kháng thể đối chứng. Mười bốn ngày sau cấy ghép ở chuột được làm giống người đôi PD-1/PD-L1 và khi xử lý bằng enzyme và cơ học đối với sự phân ly khối u; khoảng 50% tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} vẫn dương tính với PD-L1 của người.

Sự biểu hiện PD-L1 bởi nhiều dòng tế bào khối u *in vitro* được thể hiện trên Fig.6. Để đánh giá cách có thể so sánh mức độ biểu hiện của PD-L1 bởi dòng tế bào được thao tác (MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}) và dòng tế bào khối u khác của người (tế bào khối u ác tính LOX-IMVI, tế bào ung thư vú MDA-MB-231 và tế bào ung thư vú SK-Br-3), độ chuẩn liều nhuộm kháng thể kháng PD-L1 được thực hiện. Fig.6 minh họa rằng MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} có mức biểu hiện PD-L1 của người cao nhất (Fig.6A) và SK-Br-3 có mức biểu hiện thấp nhất mà không phát hiện PD-L1 (Fig.6D), trong khi sự biểu hiện PD-L1 bởi LOX-IMVI và MDA-MB-231 ở mức độ vừa phải (thấp hơn khoảng 5 lần so với MC38-cOVA/eGFP-mPD-

L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}) (Fig.6B và Fig.6C).

Trong thử nghiệm thứ hai, phép so sánh khác giữa LOX-IMVI và MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} lần lượt được thực hiện có hoặc không có điều trị in vitro bởi 100ng/mL hIFN γ / mIFN γ qua đêm. Fig.7 minh hoạ rằng cường độ huỳnh quang trung bình của PD-L1 đạt đến trạng thái ổn định ở khoảng 150nM kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng để nhuộm. Ở đường cơ sở, sự biểu hiện PD-L1 bởi LOX-IMVI ở mức độ vừa phải (thấp hơn khoảng 6 đến 7 lần so với MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}). Khi điều trị bằng mIFN γ , không có sự thay đổi đối với việc nhuộm PD-L1 trên MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}, trong khi quan sát được tăng gấp 3 lần nhuộm PD-L1 của người trong LOX-IMVI sau khi điều trị bằng hIFN γ .

Sự biểu hiện ex vivo PD-L1 bởi tế bào LOX-IMVI và MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} khoảng ba tuần sau cấy ghép ở chuột trụi lông được thể hiện trong các bảng 11 và 12.

Bảng 11: Tỷ lệ phần trăm của tế bào LOX-IMVI và MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} dương tính với PD-L1 khoảng 3 tuần sau cấy ghép ở chuột trụi lông

	Nhuộm lớp kháng thể	Nhuộm hPD- L1
LOX-IMVI	0,2%	56,6%
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD- L1 ^{Tg}	0,2%	96,2%

Bảng 12: Cường độ huỳnh quang trung bình của PD-L1 bởi tế bào LOX-IMVI và MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} khoảng 3 tuần sau cấy ghép ở chuột trụi lông

	Khối u 1	Khối u 2
LOX-IMVI	8479,1	12121,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD- L1 ^{Tg}	49589,1	51445,0

Khi xử lý bằng enzym và cơ học để cho phép phân ly khối u, nhuộm tế bào bằng kháng thể kháng PD-L1 (20 μ g/mL). Mức biểu hiện PD-L1 trên LOX-IMVI thấp hơn khoảng 5 lần so với mức biểu hiện trên tế bào khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}.

Ví dụ 6: Sự định vị lựa chọn kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ đối với khối u dương tính với hPD-L1 ở chuột trụi lông

Để xác định sự định vị in vivo của kháng thể kháng PD-L1, cho chuột trụi lông mang khối u dương tính với PD-L1 dùng trong tĩnh mạch thể tiếp hợp kháng thể DFO được đánh dấu bằng Ziriconi-89.

Dòng khối u được sử dụng cho nghiên cứu là dòng tế bào ung thư biểu mô ruột kết của chuột được gọi là MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}, mà đã được thao tác di truyền để tách PD-L1 ra khỏi chuột không có MC38 kiểu đại, nhưng biểu hiện quá mức PD-L1 nguyên vẹn của người và ovalbumin trứng gà nguyên vẹn được dung hợp với eGFP. Đối với nghiên cứu thứ hai của khối u với sự biểu hiện nội sinh của PD-L1 của người, dòng tế bào khối ác tính của người LOX-IMVI được sử dụng để thiết lập khối u in vivo đối với nghiên cứu định vị kháng thể kháng PD-L1 tiếp theo.

Kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ làm ví dụ được sử dụng cho nghiên cứu này là H1H8314N, bao gồm HCVR/LCVR của SEQ ID NO: 82/90.

Đối với nghiên cứu thứ nhất, 1 x 10⁶ tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} được cấy ghép dưới da vào trong hông bên trái của chuột đực trụi lông 8 đến 10 tuần tuổi NCr (Taconic, Hudson NY). Đối với khối u LOX-IMVI, 1 x 10⁶ tế bào được cấy ghép dưới da vào hông bên trái của chuột đực trụi lông từ 8 đến 10 tuần tuổi NCr. Một khi khối u đạt đến thể tích trung bình 50 đến 150mm³ (khoảng ngày 7 đến 10), phân chia ngẫu nhiên các chuột thành các nhóm và được cho dùng liều với thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr (H1H8314N) hoặc thể tiếp hợp kháng thể DFO của lớp kháng thể đối chứng không gắn kết được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr. Chuột trụi lông mang khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} tiếp nhận 50 $\pm$ 1 uCi kháng thể được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr với liều protein khoảng 0,6mg/kg. Trong nghiên cứu sử dụng chuột mang khối u LOX-IMVI, chuột tiếp nhận 35 $\pm$ 1 uCi kháng thể được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr với liều kháng thể cuối cùng là 0,3 hoặc 1mg/kg.

Ảnh chụp PET của sự định vị kháng thể được đánh giá 6 ngày sau khi dùng kháng thể. Sofie Biosciences G8 PET/CT (Sofie Biosciences and Perkin Elmer) được sử dụng để chụp ảnh). Thiết bị này được hiệu chuẩn trước để phát hiện ^{89}Zr trước khi chụp ảnh. Cửa sổ năng lượng nằm trong khoảng từ 150 đến 650 keV với độ phân giải đã tạo cấu trúc lại 1,4mm ở giữa trường nhìn. Chuột trải qua sự gây mê cảm ứng bằng cách sử dụng isofluran và được giữ trong dòng liên tục isofluran trong quá trình chụp ảnh. Thu được các ảnh tĩnh 10 phút bằng cách sử dụng phần mềm chụp ảnh G8 và tiếp theo được tạo cấu trúc lại bằng cách sử dụng các phép cài đặt đã tạo cấu hình trước. Dữ liệu về hình ảnh được hiệu chỉnh đối với sự phân rã và các tham số khác. Ảnh chụp CT thu được theo phương pháp chụp ảnh PET và sau đó được đồng ghi lại với ảnh PET. Chuẩn bị hình ảnh bằng cách sử dụng phần mềm xử lý VivoQuant (inviCRO Imaging Services).

Đối với sự phân bố sinh học, gây chết chuột ở thời điểm cuối cùng (5 đến 6 ngày sau dùng liều) và thu gom máu thông qua việc chọc tim. Tiếp theo, lấy mô khối u và mô thường và đặt vào ống đếm số lượng. Đo và ghi chép trọng lượng đối với mỗi mẫu. Tiếp theo, thu gom dữ liệu đếm được đối với ^{89}Zr trong CPM bằng cách đo các mẫu trên thiết bị đếm gama tự động (Wizard 2470, Perkin Elmer). Tỷ lệ phần trăm liều tiêm trên mỗi gam (%ID/g) được tính toán đối với mỗi mẫu bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn được chuẩn bị từ vật liệu tiêm.

%ID/g trung bình đối với mỗi kháng thể được thể hiện trong bảng 13.

Bảng 13: %ID/g trung bình trong mô phân tích

Mẫu	^{89}Zr -H1H8314N		^{89}Zr -lớp kháng thể đối chứng	
	%ID/g trung bình	STDEV %ID/g	%ID/g trung bình	STDEV %ID/g
Gan	3,1	0,4	0,9	0,9
Lá lách	4,4	1,1	1,5	1,3
Thận	4,0	0,7	1,4	1,6
Xương	5,1	2,6	1,7	1,6
Phổi	5,1	1,1	2,5	3,0
Tim	2,4	0,2	1,3	1,4

Máu	7,6	1,6	3,8	4,6
Tuyến ức	5,3	3,0	2,8	2,2
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} -hPD-L1 ^{Tg}	55,3	12,2	3,0	3,3
S.BOWEL	1,5	0,3	0,6	0,6

Dựa vào bảng này, sự hấp thụ ở mức cao rõ ràng trong khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg} xuất hiện trên mô bình thường khác, với sự hấp thụ của khối u là 55,3%ID/g cao hơn đáng kể so với sự hấp thụ cao nhất tiếp theo 5,3 %ID/g được quan sát ở tuyến ức. Sự hấp thụ của khối u lần lượt cao hơn gấp 7,3 lần và 17,8 lần so với hoạt tính trong máu và gan. Tính đặc hiệu của sự hấp thụ kháng thể kháng PD-L1 vào trong khối u (55,3% ID/g) là rõ rệt khi so với sự hấp thụ của khối u giảm đáng kể 3% được quan sát đối với kháng thể của lớp kháng thể đối chứng không gắn kết. Việc chụp ảnh PET theo chỉ dẫn được thực hiện trong bản mô tả này đã chứng minh sự định vị rõ ràng của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr với khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}. Ít tín hiệu nền được quan sát ở chuột ở thời điểm sau dùng liều vào ngày 6. Trái với sự định vị khối u rõ ràng mà quan sát được bằng cách sử dụng kháng thể kháng PD-L1, chỉ có hoạt tính cơ bản không rõ ràng xuất hiện trong hình ảnh của kháng thể đối chứng trong mô hình này. Hình ảnh này thể hiện rõ ràng sự hấp thụ riêng ở mức cao của kháng thể kháng PD-L1 trong khối u dương tính với PD-L1 của người, thể hiện sự định vị của kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr đối với khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg} ở chuột trại lông NCr.

Trong nghiên cứu thứ hai, khả năng của kháng thể kháng PD-L1 hướng đích lựa chọn khối u biểu hiện mức nội sinh của kháng nguyên PD-L1 của người được đánh giá. Trong bản mô tả này, chuột mang khối u ác tính LOX-IMVI của người được tiếp nhận kháng thể được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr ở các liều 0,3 và 1mg/kg. Một lần nữa, lấy khối u và mô ở ngày 6 sau tiêm và tính toán %ID/g đối với các mẫu. %ID/g trung bình đối với mỗi kháng thể được thể hiện trong bảng 14.

Bảng 14: %ID/G trung bình trong mô phân tích từ nghiên cứu thứ hai (khối u LOX-IMVI)

	⁸⁹ Zr-DFO-H1H8314N 0,3mg/kg		⁸⁹ Zr-DFO-H1H8314N 1 mg/kg		⁸⁹ Zr-lốp kháng thể đối chứng 1mg/kg	
Mẫu	%ID/g trung bình	STDEV %ID/g	%ID/g trung bình	STDEV %ID/g	%ID/g trung bình	STDEV %ID/g
Gan	2,9	0,3	3,3	0,2	3,9	0,3
Lá lách	4,2	0,2	4,3	0,9	4,2	0,7
Thận	4,3	0,4	4,3	0,8	3,4	0,4
Xương	3,2	0,6	2,7	0,5	3,6	0,4
Phổi	5,7	1,0	6,6	1,6	5,9	1,2
Tim	3,2	0,8	3,2	0,4	2,9	0,6
Máu	8,1	1,4	9,5	1,0	11,1	6,2
Tuyến ức	5,3	2,3	5,6	0,7	4,9	1,4
Khối u LOX- IMVI	20,6	2,7	10,6	2,6	12,0	1,8
S.BOWEL	1,5	0,2	1,8	0,4	2,0	0,3

Ở liều thấp hơn 0,3mg/kg, sự hướng đích đối với khối u qua mô bình thường được quan sát, với 20,6%ID/g quan sát được trong khối u LOX-IMVI. Khi chuột tiếp nhận liều cao hơn 1mg/kg, sự hấp thụ của khối giảm 10,6%ID/g quan sát được so với mức 0,3mg/kg. Điều này gợi ý rằng liều protein ở mức cao hơn và có thể là phân đoạn cao hơn của kháng thể không được đánh dấu tiếp theo dẫn đến phong bế sự hấp thụ khối u bởi kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr. Theo nội dung này, việc chụp ảnh PET được thực hiện ngay trước khi nghiên cứu phân bố sinh học cũng thể hiện rằng sự hấp thụ của kháng thể kháng PD-L1 ở liều 1mg/kg gần tương đương với sự hấp thụ của kháng thể đối chứng. Ở liều thấp hơn 0,3mg/kg, mức gia tăng về sự định vị trong khối u của kháng thể kháng PD-L1 thể hiện rõ ràng so với kháng thể đối chứng. Nói chung, hình ảnh PET và dữ liệu phân phối sinh học chứng minh sự hướng đích đặc hiệu của khối u LOX-IMVI ở liều 0,3mg/kg kháng thể kháng PD-L1.

Ví dụ 7: Sự định vị lựa chọn của kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng phóng xạ đối với khối u dương tính với hPD-L1 ở chuột

Ví dụ này mô tả sự định vị in vivo của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng Ziriconi-89 ở chuột được làm giống người đối với PD-L1. Kháng thể làm ví dụ được sử dụng trong ví dụ này là H1H8314N, bao gồm HCVR/LCVR của SEQ ID NO: 82/90.

Chuột được làm giống người đối với PD-L1 được thao tác di truyền bằng cách sử dụng kỹ thuật VelociGene® (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659; công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US2016/0157469).

Dòng tế bào khối u được sử dụng là dòng tế bào ung thư biểu mô ruột kết của chuột được gọi là MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}, được thao tác di truyền theo nhóm để biểu hiện ovalbumin trứng gà nguyên vẹn được dung hợp với eGFP và tách PD-L1 ra khỏi chuột không có MC38 kiểu đại, nhưng biểu hiện quá mức PD-L1 nguyên vẹn của người.

1×10^6 tế bào MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} được cấy ghép dưới da vào trong hông bên trái của chuột đực PD-L1 được làm giống người. Khi khối u đạt đến thể tích trung bình 50 đến 150mm³ (khoảng ngày 7), phân chia ngẫu nhiên chuột thành các nhóm và được dùng liều với thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr hoặc thể tiếp hợp kháng thể DFO của lớp kháng thể đối chứng không gắn kết được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr. Chuột được tiếp nhận 50 ± 1 uCi kháng thể được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr với liều protein cuối cùng là 1 hoặc 3mg/kg.

Ảnh chụp PET của vị trí kháng thể được đánh giá 6 ngày sau khi dùng kháng thể. Sofie Biosciences G8 PET/CT (Sofie Biosciences and Perkin Elmer) được sử dụng để chụp ảnh). Thiết bị được hiệu chuẩn trước để phát hiện ⁸⁹Zr trước khi chụp ảnh. Cửa sổ năng lượng nằm trong khoảng từ 150 đến 650 keV với độ phân giải đã cấu trúc lại 1,4mm ở giữa tầm nhìn. Chuột trải qua sự gây mê cảm ứng bằng cách sử dụng isofluran và được giữ trong dòng liên tục isofluran trong quá trình chụp ảnh. Chụp ảnh tĩnh 10 phút bằng cách sử dụng phần mềm chụp ảnh G8 và tiếp theo cấu trúc lại bằng cách sử dụng các thiết lập cấu hình trước. Dữ liệu về hình ảnh được hiệu chỉnh đối với sự phân giải và các tham số khác. Ảnh chụp CT thu được sau khi chụp ảnh PET và sau đó được đồng ghi với ảnh chụp PET. Ảnh chụp được tạo ra bằng cách sử dụng phần mềm sau xử lý VivoQuant (inviCRO Imaging Services).

Đối với sự phân bố sinh học, chuột được gây chết ở thời điểm cuối cùng (5

đến 6 ngày sau dùng liều) và thu gom máu thông qua việc chọc tim. Tiếp theo, lấy mô khối u và bình thường và đặt vào trong ống đếm. Đo và ghi chép trọng lượng đối với mỗi mẫu. Tiếp theo, dữ liệu theo số đếm đối với ^{89}Zr trong CPM được thu gom bằng cách đo mẫu trên thiết bị đo gama tự động (Wizard 2470, Perkin Elmer). Tính toán tỷ lệ phần trăm liều tiêm trên mỗi gam (%ID/g) đối với mỗi mẫu bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn được chuẩn bị từ vật liệu đã tiêm.

Kết quả

Chuột PD-L1 được làm giống người mang khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} được tiếp nhận thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr ở liều kháng thể cuối cùng 1 hoặc 3mg/kg. Thu gom máu, khối u và mô và cân trọng lượng ở ngày 6 sau khi tiêm và tính toán %ID/g đối với các mẫu dựa vào số lượng đếm từ mỗi mẫu. %ID/g trung bình đối với liều ở 1 và 3mg/kg lần lượt được thể hiện trong bảng 15 và bảng 16.

Bảng 15: %ID/g trung bình trong mô phân tích của kháng thể kháng PD-L1 ở 1mg/kg

Mẫu	%ID/g trung bình	STDEV %ID/g
Gan	8,6	1,5
Lá lách	14,1	1,1
Thận	7,8	1,0
Xương	4,5	1,4
Phổi	7,9	3,0
Tim	4,3	1,1
Máu	9,1	4,6
Tuyến ức	9,7	3,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}	34,1	18,0
S.BOWEL	2,4	0,9

Ở nồng độ liều 1mg/kg, sự hướng đích khối u của khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} xuất hiện với %ID/g là 34,1% mặc dù sự biểu hiện của PD-L1 trong mô bình thường ở chuột được làm giống người này. Ở liều này, sự định vị nhất

định của kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu ^{89}Zr xuất hiện rõ ràng trong lá lách, trong đó quan sát được sự hấp thụ kháng thể 14,1 %ID/g. Sự hấp thụ như vậy được mong đợi vì sự biểu hiện bình thường của PD-L1 của người thay cho sự biểu hiện PD-L1 của chuột của PD-L1 của người trong lá lách. Ở liều kháng thể 3mg/kg, sự định vị của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 ^{89}Zr -DFO đối với lá lách được giảm, do sự hấp thụ trung bình 9,7 %ID/g ở chuỗi mà được tiếp nhận liều kháng thể này (bảng 16).

Bảng 16: %ID/g trung bình trong mô phân tích của kháng thể kháng PD-L1 ở 3mg/kg

Mẫu	%ID/g trung bình	STDEV %ID/g
Gan	6,7	1,4
Lá lách	9,7	1,3
Thận	7,0	1,1
Xương	3,6	0,6
Phổi	11,0	1,0
Tim	4,7	0,7
Máu	12,4	2,1
Tuyến ức	7,6	0,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}	28,7	13,1
S.BOWEL	0,4	0,2

Sự hướng đích khối u rõ ràng vẫn quan sát được ở liều 3mg/kg, với trung bình 28,7%ID/g được hấp thụ bởi khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}. Do đó, mặc dù sự định vị mô bình thường giảm xuất hiện rõ ràng trong ảnh chụp liều 3mg/kg, sự định vị rõ ràng của kháng thể được đánh dấu kháng PD-L1 đối với khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} vẫn rõ ràng ở liều này. Nói chung, các kết quả này thể hiện rằng sự hướng đích rõ ràng của khối u MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} có thể xảy ra ở chuột biểu hiện PD-L1 ở vị trí thông thường của quá trình biểu hiện mô thông thường.

Các kết quả từ các nghiên cứu được thực hiện trong bản mô tả này chứng minh rõ ràng rằng kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng ^{89}Zr có thể định vị đáng kể

và riêng đối với khối u. Một nghiên cứu có thể dự đoán kích bản mà trong đó kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng trong việc lựa chọn người bệnh có khối u dương tính với PD-L1 cho phép điều trị tiếp theo bằng chất ức chế trực truyền tín hiệu PD-1/PD-L1.

Ví dụ 8: Quy trình sản xuất trên quy mô lớn để tạo ra thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO

Ví dụ này mô tả một cách chi tiết quy trình sản xuất trên quy mô lớn để tạo ra kháng thể kháng PD-L1 thích hợp để đánh dấu bằng phóng xạ bằng cách gắn p-SCN-bn-Deferoxamin (DFO) vào kháng thể kháng PD-L1 (mAb, H4H8314N) được mô tả trong bản mô tả này: (1) quá trình siêu lọc và lọc qua màng (UFDF) trước khi tiếp hợp mAb loại bỏ các tá dược mà ức chế quy trình tiếp hợp; (2) sau khi tiếp hợp trước UFDF, sự tiếp hợp của mAb với p-SCN-Bn-deferoxamin được thực hiện để tạo ra thể tiếp hợp DFO-mAb; và (3) sau tiếp hợp UFDF để loại bỏ các muối dư tạo ra nồng độ thích hợp, nồng độ tá dược và độ pH của kháng thể đơn dòng được tiếp hợp thích hợp. Tiếp theo, thể tiếp hợp DFO-mAb thu được được tạo ra ở trạng thái đậm với độ ổn định được cải thiện cho chế phẩm tiếp theo.

(1) Siêu lọc và lọc qua màng trước tiếp hợp (UFDF)

100g kháng thể kháng PD-L1 là dung dịch đậm được trao đổi vào trong 5mM dung dịch đậm axetat có độ pH = 5,50 bằng cách sử dụng màng Sius Prostream (TangenX Technology Corporation) (thể tích màng $\leq 500\text{g/m}^2$) để loại bỏ các muối dư trước khi tiếp hợp. Thể tích của quá trình này được giảm để cô đặc hơn nữa kháng thể, tiếp theo lọc vô trùng kháng thể bằng cách sử dụng màng Sartopore 2 (Sartorius) có 0,45/0,2 μm (lớp kép PES khác loại) hoặc kích cỡ lỗ tương đương. Nhiệt độ dung dịch đậm axetat được duy trì ở nhiệt độ đích $20\pm 5^\circ\text{C}$. Trộn kỹ dung dịch.

(2) Tiếp hợp

Chuyển kháng thể đã cô đặc và lọc (20g) vào bình tiếp hợp chứa hệ đệm cacbonat không chứa amin (56mM Cacbonat, 167mM natri clorua, độ pH=9,40) dẫn đến nồng độ axetat dư không đáng kể. Hòa tan DFO (25mM p-SCN-Bn-Deferoxamin) trong DMSO và thêm vào bình tiếp hợp, cùng với DMSO dư sao cho DMSO có mặt với lượng cuối cùng 5%. Thêm DFO với lượng mol dư ở tỷ lệ 4,5:1 DFO vào mAb. Tổng thể tích phản ứng bằng 2,0L. Trộn kỹ hệ đệm bằng việc thêm thành phần phản

ứng và toàn bộ thời gian phản ứng.

Điều khiển nhiều độ phản ứng trong thời gian riêng biệt bằng cách sử dụng phương trình mà có liên quan đến nhiệt độ với thời gian phản ứng. Trong trường hợp này, nhiệt độ phản ứng được duy trì ở 18°C trong 120 phút. Dừng phản ứng bằng cách thêm 2M axit axetic (23mL/L), dẫn đến dung dịch có độ pH = 6.

(3) UFDF sau tiếp hợp

Sau bước tiếp hợp, dung dịch tiếp hợp DFO-mAb đã tối là dung dịch đậm được trao đổi vào trong dung dịch đệm histidin (10mM Histidin, độ pH=5,50 với 0,0005% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 80 siêu tinh lọc được bổ sung vào dưới dạng chất chống trượt) để loại bỏ muối dư của quy trình, DMSO, và DFO không phản ứng. Khi được lọc qua màng, dung dịch được cô đặc tiếp và được bào chế tiếp. Dung dịch đệm histidin được lựa chọn để lưu trữ lâu dài protein ở -80°C. Cùng một màng Sius Prostream nêu ở bước (1) được sử dụng ở bước UFDF cuối cùng. Dung dịch tiếp hợp DFO-mAb đã cô đặc thu được được lọc vô trùng bằng cách sử dụng bộ lọc Sartopore 2 nêu trên.

UV-DAR (đích 1.5) và việc xác định nồng độ protein được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 2.

Bảng 17. Hệ số tắt tính theo mol và trọng lượng phân tử

Kháng thể	MW (g mol ⁻¹)	ϵ_{280} (L g ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ_{252} (L g ⁻¹ cm ⁻¹)
H4H8314N	144984	211480	80172

Ví dụ 9: Thử nghiệm vện và mô dự đoán tiếp xúc với hoạt tính phóng xạ ở đối tượng là người được dùng liều trong tĩnh mạch của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr

Mục đích của thử nghiệm sau là để ước tính thể nguyên vẹn và mô dự đoán tiếp xúc với hoạt tính phóng xạ ở đối tượng là người do dùng liều trong tĩnh mạch (IV) của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ⁸⁹Zr. Kháng thể kháng PD-L1 làm ví dụ được sử dụng trong thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ

là H4H8314N.

Đặc điểm của thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ

Thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ kháng PD-L1 (DFO-Ab) và thể tiếp hợp miễn dịch lớp kháng thể đối chứng (DFO-IgG4^P đối chứng) được đánh dấu bằng phóng xạ và được tinh chế để sử dụng cho nghiên cứu chụp ảnh và phân bố sinh học in vivo. Phép phân tích SEC-HPLC và tế bào dựa trên MC38/mPD-L1^{-/-}/hPD-L1 (tế bào ung thư biểu mô tuyến ruột kết MC38 của chuột được thao tác di truyền để tách PD-L1 ra khỏi chuột và biểu hiện ổn định PD-L1 của người) trong thử nghiệm in vitro được thực hiện để mô tả đặc điểm của các thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ thu được.

Độ tinh khiết monome và hoá học miễn dịch

SEC-HPLC sử dụng bộ dò phát xạ tia UV- và γ được thực hiện để đánh giá độ tinh khiết monome và hoá học phóng xạ. Các kết quả đối với chế phẩm chứa thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ của lớp kháng thể đối chứng ^{89}Zr -DFO-IgG4^P được thể hiện trên Fig.8.

Phép phân tích biểu đồ sắc ký đối với sự hấp thụ ở 280nm được thực hiện để đánh giá lượng tương đối của protein trọng lượng phân tử cao (HMW) và monome trong chế phẩm chứa thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ. Như được tổng kết trong bảng 18, các đỉnh monome (thể hiện độ tinh khiết monome) lần lượt cấu thành 99,6, 99,2 và 98,6% tổng diện tích đỉnh protein đối với chế phẩm chứa thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và lớp kháng thể đối chứng ^{89}Zr -DFO-IgG4^P; nồng độ thấp của các loại HMW (lần lượt là 0,4, 0,8 và 1,4%) cũng được phát hiện. Các protein có trọng lượng phân tử thấp (LMW) không quan sát được đối với mẫu bất kỳ trong số các mẫu thử nghiệm.

Phép phân tích biểu đồ sắc ký phóng xạ đối với sự phát ra γ được thực hiện để đánh giá lượng tương đối của ^{89}Zr được hợp nhất vào trong thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ so với ^{89}Zr không được hợp nhất (như ^{89}Zr tự do hoặc ^{89}Zr được chelat hoá với dẫn xuất DFO tự do). Như được tổng kết trong bảng 18, các đỉnh đối với ^{89}Zr không hợp nhất cấu thành $\leq 1,1\%$ tổng diện tích đỉnh phát ra γ , trong khi các đỉnh kết hợp đối với các loại monome được đánh dấu bằng phóng xạ và HMW (thể hiện độ tinh khiết hoá học phóng xạ) lần lượt cấu thành 98,9, 99,5 và 99,5% tổng diện tích đỉnh

phát ra γ đối với chế phẩm chứa thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và lớp kháng thể miễn dịch ^{89}Zr -DFO-IgG4^P.

Bảng 18: Bảng tổng kết dữ liệu SEC-HPLC

Số đỉnh	Các loại	Thời gian duy trì (phút)	Diện tích đỉnh (%)	
			Biểu đồ sắc ký	Biểu đồ sắc ký
⁸⁹ Zr-DFO-H4H8314N nghiên cứu 1				
1	HMW	13	0,4	1,1
2	Monome	16	99,6	97,8
3	⁸⁹ Zr không hợp nhất	26	n/a	1,1
⁸⁹ Zr-DFO-H4H8314N nghiên cứu 2				
1	HMW	14	0,8	1,3
2	Monome	16	99,2	98,2
3	⁸⁹ Zr không hợp nhất	26	n/a	0,5
⁸⁹ Zr-DFO-IgG4 ^P đối chứng				
1	HMW	13	1,4	1,5
2	Monome	16	98,6	98,0
3	⁸⁹ Zr không hợp nhất	26	n/a	0,5

Các giá trị theo số đối với phép phân tích SEC-HPLC được biểu diễn theo đồ hoạ trên Fig.8. Biểu đồ sắc ký UV thể hiện biểu đồ sắc ký đối với sự hấp thụ ở 280nm và biểu đồ sắc ký phóng xạ thể hiện biểu đồ sắc ký đối với cường độ phát ra γ . HMW: trọng lượng phân tử cao; n/a: không thể áp dụng.

Hoạt tính miễn dịch

Hoạt tính miễn dịch, phép đo tỷ lệ phần trăm của kháng thể được tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ mà có khả năng gắn kết kháng nguyên của nó, được xác định bằng cách ủ thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr với tế bào MC38/mPD-L1^{-/-}/hPD-L1. 2 lô thử nghiệm của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr thể hiện 84,5 và 88,8% hoạt tính miễn dịch đối với tế bào MC38/mPD-L1^{-/-}/hPD-L1 (bảng 19). Hoạt tính miễn dịch gốc không đặc hiệu 8,8% quan sát được đối với thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ của lớp kháng thể đối chứng.

Bảng 19: Hoạt tính miễn dịch của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và lớp kháng thể đối chứng ^{89}Zr -DFO-IgG4^P

Thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ	Hoạt tính miễn dịch
Thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr (lô 1)	84,5%
Thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr (lô 2)	88,8%
Lớp kháng thể đối chứng ^{89}Zr -DFO-IgG4 ^P	8,8%

Kết luận, hai lô riêng biệt thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr thể hiện hoạt tính miễn dịch cao, tỷ lệ phần trăm của độ tinh khiết monome và hoá học miễn dịch ở mức cao.

Sự phân bố sinh học của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr ở chuột

Thử nghiệm này đánh giá sự phân bố sinh học của thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ kháng PD-L1 của người, thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr , theo thời gian sau khi dùng một liều trong tĩnh mạch (IV) 50 μCi (1 mg/kg) cho chuột được làm giống người PD-L1/PD-1 (*PD-1hu/huPD-L1hu/hu*). Do H4H8314N không gắn kết với PD-L1 của chuột, phần gen *PD-L1* của chuột mã hoá miền ngoại bào PD-L1 được thay thế bằng trình tự tương ứng của người ở chuột *PD-1hu/hu-PD-L1hu/hu*. Trong chủng này, miền ngoại bào PD-1 của chuột được làm giống người theo cách tương tự. Các chuột này không được cho vào thử thách miễn dịch/viêm và do đó được dự đoán có mức biểu hiện PD-L1 không kích thích đối với tế bào miễn dịch. Hai nhóm, mỗi nhóm gồm 8 chuột bị ghiết 6 ngày (144 giờ) hoặc 10 ngày (240 giờ) sau dùng liều, thu gom máu và tiếp theo thu gom mô: tim, phổi, gan, lá lách, thận, dạ dày, ruột non, manh tràng, ruột già, xương (xương đùi), tuyến ức, cơ, bàng quang và não. Tỷ lệ phần trăm về hoạt tính phóng xạ của tổng liều đã tiêm (%ID) được định vị trong mô hoặc máu riêng được xác định và được thông báo theo giá trị

%ID trung bình trên mỗi gam (%ID/g) mô. Trước khi bị ghiết, ảnh chụp PET miễn dịch/cắt lớp bằng vi tính (CT) được chụp 1, 24, 48, 72, 144, 192 (chỉ có nhóm 10 ngày) và 240 (chỉ có nhóm 10 ngày) giờ sau khi dùng liều từ cùng một động vật.

So với nồng độ ^{89}Zr trong máu, sự hấp thụ thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr vào trong mô riêng không đáng kể trong toàn bộ thời gian nghiên cứu 10 ngày, như được đánh giá bằng phép phân tích mô ex vivo (bảng 20 và Fig.9) và chụp ảnh in vivo. So với máu ($9,4 \pm 2,2\% \text{ID/g}$), tất cả mô đã thu gom, với sự loại trừ lá lách, thể hiện nồng độ ^{89}Zr thấp hơn ($\leq 6,7\% \text{ID/g}$) vào ngày 6 sau dùng liều. Mức độ hấp thụ thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr qua trung gian đích nhỏ ($10,2 \pm 1,9\% \text{ID/g}$) quan sát được ở lá lách, phù hợp với sự biểu hiện của PD-L1 trên tế bào lá lách, như được thể hiện bởi phép đo dòng tế bào. Ở ngày 10 sau dùng liều, nồng độ ^{89}Zr trong máu đã giảm 7,8 lần so với ngày 6 sau dùng liều, cho biết sự đáp ứng kháng thể chuột chuột kháng người (MAHA) tác động đến nồng độ của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr . Sự đáp ứng MAHA quan sát được này cũng là do thực tế rằng đích, PD-L1, được biểu hiện trên tế bào trình diện kháng nguyên (Francisco, 2010), dẫn đến sự trình diện của kháng thể người đối với hệ miễn dịch của chuột và tạo ra MAHA tiếp theo. Theo cách song song, nồng độ ^{89}Zr trong gan tăng gấp 4,1 lần vào ngày 10 so với ngày 6 sau dùng liều, có thể là do sự tạo ra phức hệ miễn dịch (IC) MAHA//thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và hệ số sạch IC qua trung gian gan tiếp theo (Rojko, 2014). Ảnh chụp PET tổng thể động vật in vivo không phát hiện ra sự hấp thụ đặc hiệu mô được đánh dấu của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr nằm ngoài tín hiệu thấp đối với lá lách và sự tích tụ qua trung gian MAHA trong gan được mô tả trên đây.

Tóm lại, sự hấp thụ qua trung gian đích đã đánh dấu của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr vào mô riêng cao hơn nồng độ ^{89}Zr trong máu không quan sát được trong toàn bộ thời gian 6 ngày ở chuột được làm giống người PD-L1/PD-1 được dùng một liều IV 1mg/kg (50 μCi) thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr với sự loại trừ lá lách, trong đó mức độ hấp thụ qua trung gian đích nhỏ được quan sát phù hợp với sự biểu hiện đã chứng minh của PD-L1 trên tế bào lá lách. Dữ liệu được thu gom vượt quá ngày 6 cho đến

khi kết thúc nghiên cứu vào ngày 10 sau dùng liều chịu ảnh hưởng bởi đáp ứng MAHA.

Bảng 20: Dữ liệu phân bố sinh học ex vivo trung bình

Mô	Nồng độ ^{89}Zr vào ngày 6		Nồng độ ^{89}Zr vào ngày 10	
	Trung bình	SD	Trung bình	SD
Máu	9,4	2,2	1,2	1,4
Tim	3,1	0,6	1,2	0,4
Phổi	5,9	0,7	2,6	0,7
Gan	4,9	1,9	20,2	7,8
Lá lách	10,2	1,9	12,1	3,0
Thận	5,3	1,1	3,9	1,3
Dạ dày	0,9	0,3	0,4	0,1
Ruột non	1,5	0,3	0,9	0,1
Manh tràng	1,0	0,2	0,6	0,2
Ruột già	1,4	0,3	0,7	0,2
Xương (xương	6,3	2,1	6,9	1,4
Tuyến ức	6,7	1,6	5,3	1,1
Cơ	0,9	0,1	0,5	0,1
Bàng quang	4,3	2,1	1,7	0,9
Não	0,4	0,1	0,2	0,1

Chữ viết tắt: %ID/g = Tỷ lệ phần trăm liều đã tiêm trên mỗi gam (mô)

Ước tính thể nguyên vẹn và mô tiếp xúc với hoạt tính phóng xạ ở người

Thử nghiệm này sử dụng dữ liệu ảnh chụp PET/CT đối với bốn chuột đực được làm giống người PD-1/PD-L1 và bốn chuột cái được làm giống người PD-1/PD-L1 được chụp ảnh ở 1, 24, 48, 72, 144, 192, và 240 giờ sau khi dùng liều đơn IV 50 μCi (1mg/kg) thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr . Dữ liệu được tạo ra bằng việc dùng liều có liên quan về mặt lâm sàng này được sử dụng để ước tính sự tiếp xúc của người với hoạt tính phóng xạ. Dữ liệu về nồng độ mô được xác định bằng cách sử dụng phép phân tích thể tích quan tâm (VOI).

Để ước tính liều phóng xạ, thời gian duy trì trung bình được xác định đối với

các vùng sau: não, dạ dày, tim, thận, gan, phổi, cơ, tuyến, lá lách, bàng quang và phần còn lại của cơ thể. Các giá trị theo thời gian duy trì trung bình này được sử dụng làm dữ liệu đầu vào nhập vào chương trình phần mềm OLINDA/EXM 1.1 để ước tính liều mô được hấp thụ trung bình và liều hữu hiệu ở người.

Liều hữu hiệu của người đối với thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr được ước tính là 0,513 mSv/MBq (millisievert/megabecquerel) ở giống đực trưởng thành và 0,622 mSv/MBq ở giống cái trưởng thành. Các cơ quan dự đoán có liều hấp thụ cao nhất ở người là lá lách và gan. Liều hấp thụ ước tính ở lá lách là 0,856 mSv/MBq ở giống đực trưởng thành và 1,12 mSv/MBq ở giống cái trưởng thành. Liều hấp thụ ước tính ở gan là 0,764 mSv/MBq ở giống đực trưởng thành và 0,974 mSv/MBq ở giống cái trưởng thành.

Tỷ lệ phần trăm phân rã trung bình được hiệu chỉnh của liều tiêm trên mỗi mL (DC %ID/mL) đối với chuột đực và chuột cái ($n = 4$ chuột đực, $n = 4$ chuột cái) đối với mỗi VOI được tổng kết trong bảng 21.

Bảng 21: Dữ liệu phân bố sinh học

	Tỷ lệ phần trăm liều tiêm phân rã trung bình được hiệu chỉnh trên mỗi mL (DC %ID/mL) $\pm$ SD									
Thời gian (giờ)	1		24		48		72		144	
Giới tính	Giống cái	Giống đực	Giống cái	Giống đực	Giống cái	Giống đực	Giống cái	Giống đực	Giống cái	Giống đực
Não	1,365 $\pm$ 0,115	1,190 $\pm$ 0,050	0,903 $\pm$ 0,115	0,538 $\pm$ 0,071	0,640 $\pm$ 0,079	0,548 $\pm$ 0,218	0,685 $\pm$ 0,096	0,623 $\pm$ 0,224	0,465 $\pm$ 0,231	0,398 $\pm$ 0,073
Phổi	12,503 $\pm$ 1,146	12,498 $\pm$ 0,414	8,293 $\pm$ 0,635	7,155 $\pm$ 1,175	6,715 $\pm$ 0,370	5,888 $\pm$ 0,990	6,060 $\pm$ 0,708	5,558 $\pm$ 0,385	4,863 $\pm$ 0,316	4,585 $\pm$ 0,339
Gan	12,298 $\pm$ 0,664	12,078 $\pm$ 0,372	9,058 $\pm$ 0,793	7,200 $\pm$ 0,499	8,113 $\pm$ 0,969	6,125 $\pm$ 0,858	7,838 $\pm$ 0,932	6,203 $\pm$ 0,483	9,423 $\pm$ 1,885	6,208 $\pm$ 1,428
Tim	27,688 $\pm$ 1,942	25,695 $\pm$ 0,934	15,685 $\pm$ 1,223	13,323 $\pm$ 1,133	12,088 $\pm$ 0,883	10,25 $\pm$ 1,335	11,740 $\pm$ 1,553	9,915 $\pm$ 0,171	8,140 $\pm$ 0,598	7,463 $\pm$ 0,768
Thận	11,430 $\pm$ 0,387	12,100 $\pm$ 0,872	7,345 $\pm$ 0,322	6,783 $\pm$ 0,811	6,418 $\pm$ 0,761	5,565 $\pm$ 0,680	6,475 $\pm$ 0,493	5,568 $\pm$ 0,550	5,643 $\pm$ 0,222	4,815 $\pm$ 0,450

Lá lách	15,263 ± 2,166	15,860 ± 0,974	14,135 ± 2,010	11,265 ± 1,706	13,675 ± 2,195	9,388 ± 1,389	13,655 ± 3,606	9,920 ± 1,414	15,105 ± 2,959	10,303 ± 1,102
Bàng quang	6,045 ± 3,910	9,688 ± 4,991	1,653 ± 0,107	1,820 ± 0,283	1,443 ± 0,205	1,403 ± 0,160	1,318 ± 0,108	1,710 ± 0,346	1,115 ± 0,224	1,293 ± 0,430
Cơ	1,608 ± 0,182	1,435 ± 0,198	2,608 ± 0,196	1,780 ± 0,137	2,368 ± 0,259	1,955 ± 0,339	2,408 ± 0,181	2,148 ± 0,176	2,095 ± 0,168	1,918 ± 0,144
Dạ dày	3,238 ± 1,063	3,978 ± 0,632	2,875 ± 0,921	3,073 ± 0,566	2,478 ± 0,296	2,238 ± 0,487	2,260 ± 0,306	2,233 ± 0,491	2,380 ± 0,405	1,665 ± 0,148
Xương	3,683 ± 1,418	3,023 ± 0,244	3,310 ± 0,330	2,738 ± 0,171	4,600 ± 0,511	3,493 ± 0,716	4,850 ± 1,292	4,658 ± 1,399	8,993 ± 1,057	7,635 ± 0,872

Thời gian duy trì trung bình ước tính ở người (MRT) được nêu trong bảng 22 đối với mỗi cơ quan nguồn. MRT trong phần còn lại của cơ thể thu được bằng cách lấy số nghịch đảo của hằng số phân rã ^{89}Zr trừ đi tổng của tất cả thời gian duy trì của cơ quan nguồn (Huang et al., Biodistribution, toxicity and radiation dosimetry studies of the serotonin transporter radioligand 4-[18F]-ADAM in rats and monkeys. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010; 37: 545-555). Giá trị này biểu diễn phép ước tính bảo tồn của hoạt tính phóng xạ mô lũy tích.

Bảng 22: Thời gian duy trì trung bình của người (giờ)

Cơ quan/mô	Phân rã vật lý ¹		Tích hợp số mũ kép ²	
	Giống cái	Giống đực	Giống cái	Giống đực
Não	0,398	0,364	0,372	0,344
Dạ dày	0,511	0,476	0,492	0,480
Tim	2,433	2,279	2,290	2,154
Thận	0,868	0,818	0,832	0,794
Gan	5,902	5,919	8,240	5,938
Phổi	2,508	2,772	2,411	2,642
Cơ	17,635	23,677	13,348	17,182
Tủy đỏ	2,777	2,024	2,613	1,913
Lá lách	0,996	0,871	1,053	0,910
Bàng quang	0,299	0,491	0,315	0,405

Phần còn lại của cơ thể	78,794	73,430	81,157	80,361
-------------------------	--------	--------	--------	--------

¹Thời gian duy trì trung bình được tính toán giả định chỉ có sự phân rã vật lý sau thời điểm ngày 6

²Thời gian duy trì trung bình được tính toán dựa vào tích hợp số mũ kép của dữ liệu

Các liều mô hấp thụ ước tính đối với tất cả các cơ quan đích đối với giống đực và giống cái OLINDA/EXM 1.1 được đưa ra trong bảng 23. Liều hữu hiệu, được xác định bởi Ủy ban quốc tế về bảo vệ phóng xạ (International Commission on Radiological Protection-ICRP. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60, Pergamon Press, New York, 1991) là lượng mà được tính toán bằng cách nhân liều hấp thụ đối với cơ quan đã nêu với hệ số gia trọng nguy cơ rủi ro ngẫu nhiên và cộng các liều gia trọng với nhau. Các liều hữu hiệu ước tính được nêu ở cuối bảng 23. Các giá trị này biểu diễn phép ước tính bảo thủ của các liều hấp thụ hoạt tính phóng xạ.

Bảng 23: Các liều hấp thụ mô ước tính của người và liều hữu hiệu

Cơ quan/mô	Phân rã vật lý ¹		Tích hợp số mũ kép ²	
	Giống đực trưởng	Giống cái trưởng	Giống đực trưởng	Giống cái trưởng
Thượng thận	0,561	0,702	0,567	0,726
Não	0,179	0,237	0,182	0,234
Vú	0,366	0,459	0,379	0,466
Thành túi mật	0,601	0,692	0,610	0,751
Thành LLI	0,519	0,652	0,530	0,651
Ruột non	0,563	0,600	0,582	0,605
Thành dạ dày	0,575	0,714	0,584	0,718
Thành ULI	0,553	0,685	0,571	0,700
Thành tim	0,789	0,973	0,781	0,964
Thận	0,650	0,773	0,641	0,774
Gan	0,764	0,974	0,764	1,220
Phổi	0,575	0,705	0,561	0,700
Cơ	0,396	0,481	0,381	0,464
Buồng trứng	0,533	0,645	0,542	0,642

Tuyến tụy	0,597	0,743	0,606	0,765
Tuỷ đỏ	0,480	0,591	0,483	0,587
Tế bào tạo xương	0,604	0,777	0,625	0,779
Da	0,291	0,373	0,297	0,374
Lá lách	0,856	1,120	0,876	1,160
Tinh hoàn	0,399	NA	0,407	NA
Tuyến ức	0,481	0,605	0,484	0,601
Tuyến giáp	0,417	0,484	0,423	0,480
Thành bàng quang	0,580	0,496	0,559	0,494
Tử cung	0,545	0,638	0,554	0,636
Cơ thể	0,440	0,550	0,440	0,554
Liều hữu hiệu	0,513	0,622	0,516	0,625

¹Liều hấp thụ được tính toán dựa vào MRT giả định chỉ phân rã vật lý sau thời điểm ngày 6

²Liều hấp thụ được tính toán dựa vào MRT với tích hợp số mũ kép của dữ liệu

Chữ viết tắt: LLI = ruột già dưới, ULI = ruột già trên, NA = không áp dụng được

Các liều hấp thụ mô ước tính của người và liều hữu hiệu của người (bảng 23) dựa vào phương pháp phân rã vật lý và phương pháp tích hợp số mũ kép là tương tự. Phương pháp phân rã vật lý được lựa chọn để tạo ra bộ liều hấp thụ mô ước tính cuối cùng của người và liều hữu hiệu do sự đáp ứng MAHA rõ rệt trong mô hình chuột này. Do đó, liều hữu hiệu của người đối với thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr được ước tính là 0,513mSv/MBq ở giống đực trưởng thành và 0,622 mSv/MBq ở giống cái trưởng thành. Các cơ quan được dự đoán có liều hấp thụ cao nhất ở người là lá lách và gan. Liều hấp thụ ước tính ở lá lách là 0,856 mSv/MBq ở giống đực trưởng thành và 1,12 mSv/MBq ở giống cái trưởng thành. Liều hấp thụ ước tính ở gan là 0,764 mSv/MBq ở giống đực trưởng thành và 0,974 mSv/MBq ở giống cái trưởng thành.

Ví dụ 10: Chụp ảnh PET miễn dịch của PD-L1 trong khối u bằng cách sử dụng thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr ở người bệnh mắc khối u ác tính ở ngực tiến triển

Mục đích chính của nghiên cứu này là để xác định độ an toàn và khả năng

dung nạp của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr , trong đó kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng trong thể tiếp hợp được đánh dấu bằng phóng xạ là $^4\text{H}^3\text{N}$. Mục đích thứ hai của nghiên cứu là:

- Chỉ một phần nghiên cứu A: Để thiết lập liều lượng phù hợp của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và thời gian chụp ảnh sau truyền tối ưu, như được đánh giá bằng cách chụp ảnh và rút máu sau khi truyền chất đánh dấu.
- Chỉ một phần nghiên cứu B: Để thiết lập độ tin cậy thử nghiệm/thử nghiệm lại của phép đo PET như được đánh giá đối với hai lần truyền chất đánh dấu riêng biệt ở liều lượng tối ưu và thời điểm chụp ảnh như được xác định trong phần A.
- Để mô tả đặc điểm profin dược động học (PK) của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr dựa vào nồng độ hoạt tính trong huyết tương của chất đánh dấu.

Đây là nghiên cứu hai phần đánh dấu mở được thiết kế để ước tính độ an toàn và khả năng dung nạp của PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr . Phần nghiên cứu A sẽ thiết lập liều lượng phù hợp và liều hoạt tính của PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và thời gian chụp ảnh sau truyền tối ưu. Độ biến đổi của thử nghiệm/thử nghiệm lại của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr sẽ được ước tính trong phần B.

Tất cả người bệnh sẽ trải qua các quy trình sàng lọc. Người bệnh mà đáp ứng đủ tiêu chuẩn sẽ trải qua quá trình chụp ảnh ^{18}F -fludeoxyglucoza (^{18}F -FDG) PET/chụp cắt lớp bằng vi tính (CT) và quét CT chẩn đoán để đánh giá khả năng tồn tại do thương tổn, sự định vị và kích thước. Sẽ không cần thiết phải thực hiện phương pháp quét này nếu sẵn có hình ảnh có chất lượng thích hợp mà thu được trong 28 ngày dùng liều thứ nhất mong đợi của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng ^{89}Zr .

Phần A

Ba nhóm liều theo trình tự được được lập kế hoạch để được điều trị đánh dấu mở với thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr ở 5mg, 10mg hoặc 20mg.

Sau khi truyền với thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu

bằng ^{89}Zr , người bệnh sẽ trải qua việc chụp PET/CT thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr vào ngày 1, ngày 4 ± 1 và ngày 7 ± 1 . Việc chụp ảnh bổ sung có thể được thực hiện đến ngày 10. Người bệnh sẽ trải qua phép đánh giá độ an toàn và cung cấp mẫu cho phép phân tích huyết học, hoá học, thử nghiệm độ an toàn miễn dịch, được động học, kháng thể kháng được chất và phân tích chỉ thị sinh học.

Người bệnh sẽ tiếp tục trải qua quá trình đánh giá độ an toàn, bao gồm thử đánh giá thể chất, tín hiệu sống và ghi chép các sự kiện bất lợi (AE), đến ngày 21 sau khi truyền tác nhân đánh dấu kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr .

Các quyết định theo thang liều để nhận biết liều thích hợp sẽ được thông báo theo dữ liệu về độ an toàn và khả năng dung nạp và theo đánh giá về tính dương của ảnh chụp cắt lớp phát xạ positron miễn dịch (iPET) và nồng độ hoạt tính của chất đánh dấu trong huyết tương, như được mô tả dưới đây.

Nhóm liều trong phần A

Tối đa đến 3 nhóm liều gia tăng được lập kế hoạch. Đối với mỗi nhóm liều, 2 người bệnh ban đầu sẽ được cho dùng liều, với khoảng thời gian tối thiểu 48 giờ giữa mỗi lần dùng liều của mỗi người bệnh. Khi kết thúc chụp cắt lớp PET/CT ngày 7 ± 1 đối với người bệnh thứ hai ở liều đã nêu, tất cả ảnh chụp khả dụng, nồng độ của chất đánh dấu trong huyết tương, định lượng lâm sàng và dữ liệu về độ an toàn sẽ được đánh giá. Dựa vào kết quả đánh giá này, quyết định sẽ được đưa ra:

- * Mở rộng nhóm 6 người bệnh, nếu có tính dương hấp thụ của khối u/định vị khối u trong ít nhất 1 người bệnh, như được xác định theo tỷ lệ khối u với máu >1
- * Tăng đến nhóm liều tiếp theo nếu có sự hấp thụ và nồng độ hoạt tính của chất đánh dấu trong huyết tương không phù hợp, với sự phù hợp được xác định bởi giá trị hấp thụ tiêu chuẩn hoá của máu (SUV) nằm trong khoảng từ 1 đến 5 ở thời điểm chụp ảnh tối ưu
- * Diễn ra với nhóm liều tiếp theo ở liều thấp hơn, dựa vào sự hấp thụ của khối u không phù hợp và nồng độ hoạt tính của chất đánh dấu trong huyết tương phù hợp.

Nếu sự định vị trong khối u không phù hợp ở ít nhất 2 người bệnh ở tất cả ba nồng độ liều được đề xuất và việc này được xác định là do tỷ lệ tín hiệu so với độ nhiễu của ảnh thấp, liều hoạt tính sẽ được gia tăng đến tối đa 185MBq để mở rộng hơn nữa nhóm liều đã thử nghiệm trước.

Phần B

Nghiên cứu phần B sẽ bắt đầu khi liều của thể tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr phù hợp và thời gian chụp ảnh tối ưu đã được xác định trong phần A. Vào ngày 1 của phần B, người bệnh sẽ tiếp nhận liều tác nhân đánh dấu. Sau khi tiếp nhận chất đánh dấu, người bệnh sẽ trải qua việc chụp cắt lớp ở thời gian tối ưu như được xác định trong phần A. Người bệnh trong phần B sẽ tiếp nhận liều thứ hai của tác nhân đánh dấu và chụp cắt lớp sau khoảng thời gian giữa các liều từ 14 đến 28 ngày. Thời gian thực của liều tác nhân đánh dấu thứ hai sau khoảng thời gian này sẽ được xác định dựa vào kết quả của nhóm A.

Người bệnh sẽ trải qua các đánh giá về độ an toàn, bao gồm đánh giá thể chất, tín hiệu sống và ghi chép các sự kiện bất lợi (AE) trong quá trình và sau các lần thăm khám mà trong đó tác nhân đánh dấu kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr được dùng. Trong thời gian thăm khám này, người bệnh sẽ cung cấp mẫu để đánh giá PK, huyết học, hoá học và độ an toàn miễn dịch.

Đối với cả phần A và phần B, người bệnh sẽ tiếp tục trải qua các đánh giá về độ an toàn, bao gồm đánh giá thể chất, tín hiệu sống và ghi chép AE, đến tối đa 21 ngày sau lần truyền cuối cùng tác nhân kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr .

Thời gian nghiên cứu

Đối với phần A, người bệnh sẽ có khoảng thời gian sàng lọc đến 28 ngày (4 tuần) và khoảng thời gian tiếp theo đến tối đa 21 ngày (khoảng 3 tuần) sau khi truyền liều tác nhân đánh dấu. Thời gian của nghiên cứu phần A là khoảng 7 tuần, bao gồm thời gian sàng lọc.

Đối với phần B, người bệnh sẽ có khoảng thời gian sàng lọc đến tối đa 28 ngày (4 tuần), khoảng thời gian giữa các lần truyền đến tối đa 28 ngày (4 tuần) và khoảng thời gian an toàn tiếp theo ngày 21 (tuần 3) mà bao gồm khoảng thời gian sàng lọc thứ hai. Tổng thời gian của nghiên cứu đối với mỗi người bệnh sẽ đến tối đa 11

tuần, bao gồm khoảng thời gian sàng lọc.

Thời gian kết thúc nghiên cứu đối với nghiên cứu này được xác định là lần thăm khám cuối cùng của người bệnh cuối cùng.

Đối với nghiên cứu phần A, 3 nồng độ liều theo trình tự của tối đa 6 người bệnh được lập kế hoạch đối với mỗi nhóm, với 3 nhóm được lập kế hoạch, đối với tổng cộng tối đa 18 người bệnh. Đối với nghiên cứu phần B, tối đa 10 người bệnh sẽ được tham gia. Sự tham gia tối đa 28 người bệnh trong một vị trí nghiên cứu được lập kế hoạch đối với toàn bộ nghiên cứu.

Quản thể đích người bệnh

Quản thể đích sẽ gồm có người bệnh 18 tuổi hoặc già hơn mắc khối u ác tính lồng ngực tiến triển và điểm số IHC PD-L1 để chẩn đoán hoặc sinh thiết tiếp theo $\geq 1\%$ (điểm số IHC dương tính với PD-L1 theo thử nghiệm 22C3 PharmDx, Dako North America Inc.).

- Đối với phần A, khối u ác tính lồng ngực sẽ được giới hạn ở NSCLC, ung thư biểu mô tuyến ngả ba dày dày-thực quản và ung thư dạ dày, với điểm số PD-L1 $\geq 1\%$ theo IHC.
- Đối với phần B, tất cả người bệnh mắc khối u ác tính lồng ngực tiến triển và điểm số PD-L1 $\geq 1\%$ theo IHC sẽ đủ tiêu chuẩn. Người bệnh cũng phải mắc bệnh ổn định như đối với RECIST 1.1 giữa hai nghiên cứu chụp ảnh gần nhất.

Tất cả người bệnh yêu cầu liệu pháp điều trị sẽ dựa vào tiêu chuẩn của liệu pháp điều trị chăm sóc.

Điều trị

Thế tiếp hợp kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr , thế tiếp hợp miễn dịch phóng xạ bằng cách cho tác nhân chelat hoá hai chức (p-SCN-Bn-DFO) tiếp hợp cộng hoá trị với H4H8314N (kháng thể đơn dòng kháng PD-L1) và đánh dấu bằng phóng xạ hợp chất này với ^{89}Zr . Kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr được cung cấp trong tá dược dạng lỏng được đệm trong nước.

Đối với phần A, kháng thể kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr sẽ được dùng IV vào ngày 1 (đường cơ sở). Đối với phần B, kháng thể kháng PD-L1

DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr sẽ được dùng IV vào ngày 1 và ngày 7 ± 3 . Thời gian thực của liều thứ hai trong phần B sẽ được xác định dựa vào kết quả của phần A.

Tác nhân đánh dấu kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr sẽ được dùng ở nồng độ liều thấp hơn mức tiếp xúc tích tụ đã ước tính ở người dựa vào các mô hình PK và thấp hơn mức mà ở đó tác nhân kháng PD-L1 khả dụng hiện tại được sử dụng để điều trị kháng ung thư. Nghiên cứu này sẽ loại trừ người bệnh mà hiện tại được điều trị bằng tác nhân kháng PD-L1 để tránh sự cạnh tranh đối với đích.

Điểm cuối

Điểm cuối chính trong nghiên cứu này là tỷ lệ mắc và mức trầm trọng của các sự kiện bất lợi của phép điều trị khẩn cấp (TEAE) đến ngày 21 của liều truyền tác nhân đánh dấu cuối cùng ở người bệnh mắc khối u ác tính lồng ngực với tác nhân đánh dấu kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr .

Chỉ đối với phần A, nghiên cứu sẽ thiết lập liều phù hợp và liều hoạt tính của tác nhân đánh dấu kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và thời gian chụp ảnh sau truyền tối ưu và tiếp theo sẽ được xác định thông qua việc rút máu và chụp ảnh ở ngày 1, 4, và 7 sau khi truyền tác nhân đánh dấu:

- Giá trị hấp thụ tiêu chuẩn hoá của tác nhân đánh dấu kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr trong máu, với sự tính toán tiếp theo về tỷ lệ khối u với máu tại thời điểm chụp ảnh
- Liều lâm sàng dựa vào liều hấp thụ và mức phóng xạ mô hữu hiệu, như được tính toán dựa vào dữ liệu thu được về ảnh chụp PET và nồng độ hoạt tính của tác nhân đánh dấu trong máu
- Giá trị hấp thụ tiêu chuẩn (SUV) qua toàn bộ vùng khối u quan tâm (ROI)
- SUV tối đa (SUVmax) trong khối u ROI
- Nồng độ hoạt tính trong huyết tương của tác nhân đánh dấu, được biểu diễn theo SUV, với sự tính toán diện tích dưới đường cong đến ngày 7 (AUC_{0-7})

Chỉ đối với phần B, nghiên cứu sẽ thiết lập độ tin cậy thử nghiệm/thử nghiệm lại của phép đo PET thể tiếp hợp kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr và tiếp theo được xác định dựa vào các phép đo của 2 lần truyền tác nhân đánh dấu riêng biệt

ở liều phù hợp và thời điểm chụp ảnh tối ưu, như được xác định dựa vào phần A:

- SUV của máu theo sự tính toán tiếp theo của tỷ lệ khối u với máu
- SUV quan toàn bộ ROI khối u
- SUV_{max} trong ROI khối u
- Sự phân bố sinh học của thể tiếp hợp kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr

Dữ liệu thu được sẽ cho biết độ an toàn và khả năng dung nạp của thể tiếp hợp kháng PD-L1 DFO được đánh dấu bằng ^{89}Zr .

Các phương án và ví dụ được mô tả trên đây chỉ đơn thuần nhằm mục đích minh họa và không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết hoặc sẽ có khả năng xác định bằng cách sử dụng không nhiều hơn thử nghiệm thông thường, nhiều dạng tương đương của các hợp chất, vật liệu và các quy trình cụ thể. Tất cả các dạng tương đương như vậy đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế và được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thẻ tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với phối tử 1 chết theo chương trình (PD-L1) monome của người, gốc chelat hoá, và tác nhân phát xạ positron, trong đó:

(i) kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba vùng quyết định bổ sung (CDR) trong vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự SEQ ID NO: 82; và ba CDR trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự SEQ ID NO: 90;

(ii) gốc chelat hoá bao gồm desferioxamin; và

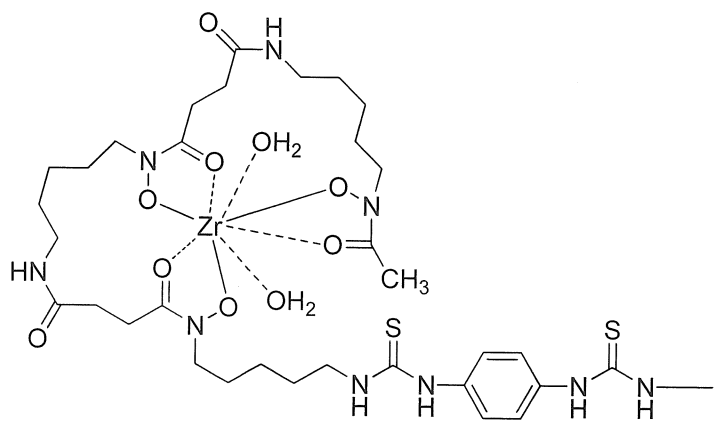
(iii) tác nhân phát xạ positron là ^{89}Zr .

2. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó đã nêu được liên kết cộng hoá trị với một hoặc nhiều gốc có công thức (A):



(A)

trong đó L là gốc chelat hoá; M là tác nhân phát xạ positron; và z, trong mỗi trường hợp độc lập, là 0 hoặc 1 trong đó ít nhất một trong số z là 1; và trong đó -L-M là



trong đó Zr là tác nhân phát xạ positron ^{89}Zr .

3. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được liên kết cộng hoá trị với một, hai hoặc ba gốc có công thức (A).

4. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể bao gồm ba vùng quyết định bổ sung chuỗi nặng, HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và ba vùng quyết định bổ sung chuỗi nhẹ, LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 84; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 86; HCDR3 chứa

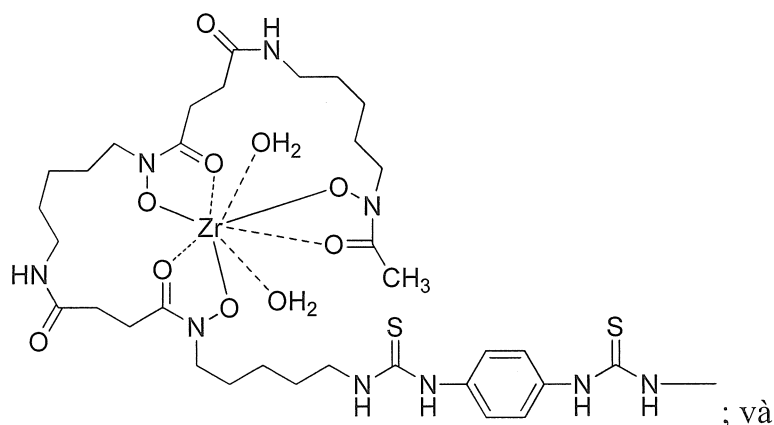
trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 96.

5. Phương pháp chụp ảnh mô biểu hiện PD-L1, trong đó phương pháp này bao gồm bước dùng thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ theo điểm 1 cho mô; và hiển thị hoá sự biểu hiện PD-L1 bằng cách chụp cắt lớp phát xạ positron (PET).

6. Thể tiếp hợp kháng thể được đánh dấu bằng phóng xạ bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với phối tử 1 chết theo chương trình (PD-L1) của người, gốc chelat hóa, và tác nhân phát xạ positron, trong đó:

(i) kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2, và HCDR3) và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, và LCDR3), trong đó HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 84; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 86; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 96;

(ii) gốc chelat hóa bao gồm



(iii) Zr là tác nhân phát xạ positron ^{89}Zr .

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 Kelly, Marcus
 Ma, Dangshe
 Olson, William
 Thurston, Gavin

<120> THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ ĐƯỢC ĐÁNH DẤU BẰNG PHÓNG XẠ VÀ PHƯƠNG
 PHÁP CHỤP ẢNH MÔ BIỂU HIỆN PD-L1

<130> 10305WO01

<140> TBD

<141> 2017-12-01

<160> 344

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc
 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttttagt aggttttgga tgagctgggt ccgccaggct
 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaaccaag atggaactga gaaatactat
 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat
 240

ctgcaaatac acagcctgag agccggggac acggctgtgt attactgtgc gaatacgtat
 300

tacgattttt ggagtgggtca ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc
 360

tca

363

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 2

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 Arg Phe
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Asp Gly Thr Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu 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 ttagtaggtt ttgg
 24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Trp
 1 5

<210> 5
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 5
 ataaaccaag atggaactga gaaa
 24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 6
 Ile Asn Gln Asp Gly Thr Glu Lys
 1 5

<210> 7
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 7
 gcgaatacgt attacgattt ttggagtggg cactttgact ac
 42

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 8
 Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly His Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 9

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgtc gggccagtca gaggattagt aattgggttg cctggatatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatcatagtt attcgtacac ttttggccag
300

gggaccaagc 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 Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Ser Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 11

cagagtatta gtaattgg

18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Asn Trp

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 13

aaggcgtct

9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 14

Lys Ala Ser

1

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 15

caacagtatc atagttattc gtacact

27

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 16

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 17
 caggagcacc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
 60

tcctgtgaag cgtctggatt caccttcagt aactttggca tgcactgggt ccgccaggct
 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct ttatgggtctg atggaagtaa taaatactat
 180

gcagactccg tgaaggggtcg agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat
 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attactgtgc gagagggaga
 300

ggagcccccg gtattccgat ttttgggtac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc
 360

tca
 363

<210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 18

Gln Glu His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Leu Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Val 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

Ala Arg Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 19
ggattcacct tcagtaactt tggc
24

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly
1 5

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 21
ttatggtctg atggaagtaa taaa
24

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 22

Leu Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 23
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 23
gcgagaggga gaggagcccc cggattccg atttttgggt ac
42

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 24

Ala Arg Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 25
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 25
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagcgct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

agattcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctacagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataatagtt accctctcac attcggcgga
300

gggaccaagg tggcgatcaa a
321

<210> 26
<211> 107
<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	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp
			20					25					30		

Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Ala	Ile	Lys
			100					105		

<210> 27
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 27
cagggcatta gaaatgat
18

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 28

Gln Gly Ile Arg Asn Asp
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 29
actgcatcc
9

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 30

Thr Ala Ser
1

<210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 31
ctacaacata atagttaccc tctcaca
27

<210> 32

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 32

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 33
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc
 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct
 120

ccaggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagga aaactgatgg tgggacaaca
 180

gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaatagc
 240

ctgcatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca
 300

gatgatattg tagttgtacc agctgttatg agggaatact acttcggtat ggacgtctgg
 360

ggccaaggga ccacggtcac cgtctctctca
 390

<210> 34
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 34

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 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr 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

Leu His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Val Met Arg Glu
 100 105 110

Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 35
 ggattcactt tcagtaacgc ctgg
 24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
 1 5

<210> 37
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 37

attaaaagga aaactgatgg tgggacaaca

30

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 38

Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr

1

5

10

<210> 39

<211> 63

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 39

accacagatg atattgtagt tgtaccagct gttatgaggg aatactactt cggtatggac

60

gtc

63

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 40

Thr Thr Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Val Met Arg Glu Tyr Tyr

1

5

10

15

Phe Gly Met Asp Val

20

<210> 41

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 41

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc ggacaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataataatt acccgtagac ttttggccag
300

gggaccaagc tggagatcaa a
321

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 42

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 Thr Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 43
 cagggcatta gaaatgat
 18

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 44

Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 45
 gctgcatcc
 9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 46

Ala Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 47
ctacagcata ataattaccc gtacact
27

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 48

Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 49
caggtgcaat tgggtgcagtc tggggcgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgcaggtc
60

tcttgcaagg cttctggata ctcttcacc ggctactata tacactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag gacttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtggcac caaaaagtat
180

gcacacaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcga cacagcctac
240

atgattttga gcagtctgat atccgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgag
300

gactggaact ttgggagctg gttcgactcc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 50
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 50

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

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Thr Lys Lys Tyr Ala His Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Ile Leu Ser Ser Leu Ile Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Phe Gly Ser Trp Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 51
 ggatactcct tcaccggcta ctat
 24

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 52

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 53
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 53
 atcaacccta acagtggcac caaa
 24

<210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 54

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Thr Lys
 1 5

<210> 55
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 55
 gcgagagatg aggactggaa ctttgggagc tggttcgact cc
 42

<210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 56

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Phe Gly Ser Trp Phe Asp Ser
 1 5 10

<210> 57
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 57

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgga gccggcctcc
60

atctcctgca ggtctagtca aaccctcgta cacggtgatg gaaacacgta cttgagttgg
120

attcagcaga ggccaggcca gcctccgaga ctctcattt ataaggtttc taatcagttc
180

tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc
240

agcaggggtg aagctgagga tgtcgggctt tatttctgca tgcaagctac acattttccg
300

atcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaa
336

<210> 58

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 58

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	Thr	Leu	Val	His	Gly
			20				25					30			

Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Ile	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro
		35					40					45			

Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Gln	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
		50				55					60				

Asp	Arg	Phe	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	Leu	Tyr	Phe	Cys	Met	Gln	Ala
			85					90						95	

Thr	His	Phe	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 59

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 59

caaaccctcg tacacggtga tggaaacacg tac
33

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 60

Gln Thr Leu Val His Gly Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 61

aaggtttct
9

<210> 62

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 62

Lys Val Ser

1

<210> 63

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 63

atgcaagcta cacattttcc gatcacc
27

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 64

Met Gln Ala Thr His Phe Pro Ile Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 65
 caggtacacc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc
 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tacattgggt gcgacaggcc
 120

cctggacacg ggcttgagtg gatgggatgg ctcaacccta atactggtac cacaaagtat
 180

atacagaact ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag cacagcctac
 240

atggagctga ccaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgag
 300

gactggaatt atgggagctg gttcgacacc tggggccagg gaacctggt cacagtctcc
 360

tca
 363

<210> 66
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 66

Gln Val His 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 Gly Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Leu Asn Pro Asn Thr Gly Thr Thr Lys Tyr Ile Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Thr Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Gly Ser Trp Phe Asp Thr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 67
ggatacacct tcaccggcta ctat
24

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 68

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 69
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 69

ctcaacccta atactggtac caca
24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 70

Leu Asn Pro Asn Thr Gly Thr Thr
1 5

<210> 71

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 71

gcgagagatg aggactggaa ttatgggagc tgggttcgaca cc
42

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 72

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Gly Ser Trp Phe Asp Thr
1 5 10

<210> 73

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 73

gatattgtaa tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgaca gccggcctcc
60

atctcctgca ggtctagtcc aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg
120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatatt ataagatttc taaccgattc
180

tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagggg cagatttcac gctgaaaatc
240

agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggt tattactgca tgcaagctac acattttccg
300

atcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaga
336

<210> 74
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 74

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 Pro Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn 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 Phe 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

Thr His Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg
100 105 110

<210> 75
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 75
ccaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac
33

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 76

Pro	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr
1				5					10	

<210> 77
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 77
aagatttct
9

<210> 78
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 78

Lys	Ile	Ser
1		

<210> 79
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 79
atgcaagcta cacattttcc gatcacc
27

<210> 80

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 80

Met Gln Ala Thr His Phe Pro Ile Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 81
 gaggtgcagc tgggtggaatc tgggggaggt gtggtgcggc ctgggggggc cctgagactc
 60

tcctgtgcag cctctggatt cacttttgat gattatggca tgacctgggt ccgccaagct
 120

ccagggaggg gcctggaatg ggtctctgggt attcattggc atggtaaacg cacaggttat
 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccata tccagagaca acgccaagaa atccctgtat
 240

ctgcaaatga acagtctgaa aggcgaggac acggccttgt atcattgtgt gaggggggga
 300

atgagtacag gggactgggt cgaccctgg ggccaggga ccttggtcat cgtctcctca
 360

<210> 82
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile His Trp His Gly Lys Arg Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Gly Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 83
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 83
ggattcactt ttgatgatta tggc
24

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 85
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 85
attcattggc atggtaaacg caca
24

<210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 86

Ile His Trp His Gly Lys Arg Thr
 1 5

<210> 87
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 87
 gtgagggggg gaatgagtac aggggactgg ttcgacccc
 39

<210> 88
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 88

Val Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 89
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 89
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctctaggaga cagagtcacc
 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac agttatttaa attggtatca gcagaaacca
 120

gggaaagccc ctaaactcct gatctatgtt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcaa tctgcaacct
240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc
300

caagggacac gactggagat taaa
324

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 90

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn 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 Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn 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> 91

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 91

cagagcatta acagttat
18

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 92

Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 93
 gttgcatcc
 9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 94

Val Ala Ser
 1

<210> 95
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 95
 caacagagtt acagtacccc tccgatacacc
 30

<210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 96

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 97

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 97

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc cggggggggc cctgagactc
 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgacctgggt ccgccaagtt
 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctctgggt attcattgga gtggtagaag cacaggttat
 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat
 240

ctgcaaata acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gaggggggga
 300

atgagtacgg gggactgggt cgacccctgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca
 360

<210> 98

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 98

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile His Trp Ser Gly Arg Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

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
ggattcacct ttgatgatta tggc
24

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 101
attcattgga gtggtagaag caca
24

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 102

Ile His Trp Ser Gly Arg Ser Thr
1 5

<210> 103

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 103

gcgagggggg gaatgagtagc gggggactgg ttcgacccc
39

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 104

Ala Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 105

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 105

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc
300

caagggacac gactggagat taaa
324

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 106

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 Val 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> 107
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 107
cagagcatta gcagctat
18

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 108

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 109

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 109

gttgcatcc
9

<210> 110

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 110

Val Ala Ser

1

<210> 111

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 111

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc
30

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 112

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 113
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 113
 gaggtgcagt tggaggagtc tggaggagtc ttgggtccagc ctgggggggtc cctaagactc
 60
 tctctgtgcag cctctggggtt caccgtcggg agtaactaca tgaactgggt ccgtcagggt
 120
 ccagggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttatagtg gtggtagtag atactacgca
 180
 gattccgtga agggccgatt caccatctcc agactcactt ccaagaacac actgtatctt
 240
 caaatgagca gcctgagacc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgcgag agggattagg
 300
 ggtctggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cttca
 345

<210> 114
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 114

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

Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 115
 ggggttcaccg tcggtagtaa ctac
 24

<210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 116

Gly Phe Thr Val Gly Ser Asn Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 117
 atttatagtg gtggtagtagtac a
 21

<210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 118

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr

1

5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 119
 gcgagaggga ttaggggtct ggacgtc
 27

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 120

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val
 1 5

<210> 121
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 121
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60

atcacttgcc gggcaagtca gaccattaac atctatttaa attggtatca gcagaaacca
 120

gggagagccc ctaggctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaccag agttacagta cccctccgat caccttcggc
 300

caagggacac gactggagat taaa
 324

<210> 122
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 122

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 Asn Ile Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Arg 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 His 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> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 123

cagaccatta acatctat
18

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 124

Gln Thr Ile Asn Ile Tyr
1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 125
 gctgcatcc
 9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 126

Ala Ala Ser
 1

<210> 127
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 127
 caccagagtt acagtacccc tccgatcacc
 30

<210> 128
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 128

His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 129
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 129

gaggaacggt tggtaggagtc tggaggagac ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tctctgtcag cctctggcat caccgtcggc actaattata tgaactgggt cgcgcagggt
120

ccagggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttctagcg gtggaatac acactacgca
180

gactccgtga agggccgatt cattatgtcc agacaaactt ccaaaaacac gctgtatctt
240

cagatgaata gcctggaaac tgaggacacg gccgtatatt attgtgcgag ggggatcaga
300

ggtttggacg tctggggcca agggaccatg gtcaccgtct cctca
345

<210> 130

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 130

Glu	Glu	Arg	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	Ile	Thr	Val	Gly	Thr	Asn
			20					25					30		

Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			

Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	50					55					60				

Gly	Arg	Phe	Ile	Met	Ser	Arg	Gln	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65						70				75					80

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Glu	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Arg	Gly	Ile	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr
			100					105					110		

Val Ser Ser

115

<210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 131
 ggcatcacccg tcggtactaa ttat
 24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 132

Gly Ile Thr Val Gly Thr Asn Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 133
 atttctagcg gtggtaatac a
 21

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 134

Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 135

gcgaggggga tcagaggttt ggacgtc
27

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 136

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val
1 5

<210> 137

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 137

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gagcatgagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
120

gggagagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc
300

caagggacac gactggagat taaa
324

<210> 138

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 138

40734

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 Met Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys 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 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> 139
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 139
cagagcatga gcagctat
18

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 140

Gln Ser Met Ser Ser Tyr
1 5

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 141
gctgcatcc
9

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 142

Ala Ala Ser
1

<210> 143
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 143
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc
30

<210> 144
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 144

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 145
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 145
caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagatgc ctgggtcctc ggtgagggtc
60

tcctgcaagg cttctggagg catcttcagc agttctacta tcagttgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgaatg gatgggagag atcatccctg tctttggtac agtaaactac
180

gcacagaagt tccaggacag agtcatatct accgcggacg aatctacgac tacagcctac
240

atggagctga gcagcctgaa atctggggac acggccgtat atttctgtgc gcgaaattgg
300

ggattaggct ctttttatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca
354

<210> 146

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 146

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Ile Phe Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Trp Gly Leu Gly Ser Phe Tyr Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 147

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 147

ggaggcatct tcagcagttc tact
24

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 148

Gly Gly Ile Phe Ser Ser Ser Thr
1 5

<210> 149

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 149

atcatccctg tctttggtac agta
24

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 150

Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Val
1 5

<210> 151

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 151

gcgcgaaatt ggggattagg ctctttttat atc
33

<210> 152
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 152

Ala Arg Asn Trp Gly Leu Gly Ser Phe Tyr Ile
1 5 10

<210> 153
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 153
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagttttaac ttcaactact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcaa caggctggag
240

cctgaagatt ttggagtgtt ttattgtcag cagtatgaaa gcgcaccttg gacgttcggc
300

caagggacca aggtggaaat caaa
324

<210> 154
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 154

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 Phe Asn Phe Asn

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 Asn Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Gly Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Ser Ala Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 155
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 155
 cagagtttta acttcaacta c
 21

<210> 156
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 156

Gln Ser Phe Asn Phe Asn Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 157
 ggtgcatcc
 9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 158

Gly Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 159
 cagcagtatg aaagcgcacc ttggacg
 27

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 160

Gln Gln Tyr Glu Ser Ala Pro Trp Thr
 1 5

<210> 161
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 161
 gaggtgcagc ttgtagagtc tgggggagac ttggtacatc ctggcaggtc cctgagactc
 60

tcctgtgcag cctctggttt cccctttgat gagtatgcca tgcactgggt ccggcaagtt
 120

ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga gtaataataa cataggctat
 180

gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaacaaa ctccctgtat
240

ctacaaatga acagtctgag acctgaggac acggcctttt attactgtgc aaaatctgga
300

atcttttgact cctggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca
345

<210> 162

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 162

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val His Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 163

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 163

ggtttcccct ttgatgagta tgcc
24

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 164

Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr Ala
1 5

<210> 165
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 165
attagttgga gtaataataa cata
24

<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 166

Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile
1 5

<210> 167
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 167
gcaaaatctg gaatctttga ctcc
24

<210> 168
<211> 8
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 168

Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser
1 5

<210> 169

<211> 315

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 169

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
120

gggaagctcc tgatctatgc tgcattccagt ttgcaaagtg ggggtcccatc acggttcagt
180

ggcgggtggat ctgggacaga tttcactctc accatcagca gtctgcgacc tgaagatttt
240

gcaacttact actgtcaaca gagttactgt acccctccga tcaccttcgg ccaagggaca
300

cgactggaga ttaaa
315

<210> 170

<211> 105

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 170

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 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
35 40 45

Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Phe
65 70 75 80

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Cys Thr Pro Pro Ile Thr Phe
85 90 95

Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 171
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 171
cagagcatta gcagctat
18

<210> 172
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 172

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 173
gctgcatcc
9

<210> 174
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 174

Ala Ala Ser
 1

<210> 175
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 175
 caacagagtt actgtacccc tccgatcacc
 30

<210> 176
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 176

Gln Gln Ser Tyr Cys Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 177
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 177
 gaggtgcagc tgggtggagtc cggggggaggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc
 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt cgcagggt
 120

ccaggcaagg gactggagtg ggtgacactt atatcatatg agggaaggaa taaatactat
 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgc gaaagatagg
 300

accctttacg gtatggacgt ctggggccaa ggaaccacgg tcaccgtctc ctca
354

<210> 178
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 178

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Leu Ile Ser Tyr Glu Gly Arg 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 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Thr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 179
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 179
ggattcacct tcagtagtta tggc
24

<210> 180
<211> 8

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 180

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 181
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 181
 atatcatatg aggggaaggaa taaa
 24

<210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 182

Ile Ser Tyr Glu Gly Arg Asn Lys
 1 5

<210> 183
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 183
 gcgaaagata ggacccttta cggatatggac gtc
 33

<210> 184
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 184

Ala Lys Asp Arg Thr Leu Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 185
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 185
caggtcacct tgagggagtc tggctctgcg ctggtgaaaa ccacacagac cctcacactg
60

acctgcacct tctctgggtt ctactcagc actaatagaa tgtgtgtgac ctggatccgt
120

cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcgcgcattg attgggatgg tgttaaatac
180

tacaacacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctccaa aaaccaggtg
240

gtccttaciaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca ctttttactg tgcacgggtcg
300

acttcgttga ctttttacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc
360

tca
363

<210> 186
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 186

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Thr 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

Arg Met Cys Val Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Val Lys Tyr Tyr Asn Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser 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 Phe Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Thr Ser Leu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 187
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 187
gggttctcac tcagcactaa tagaatgtgt
30

<210> 188
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 188

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Asn Arg Met Cys
1 5 10

<210> 189
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 189
attgattggg atggtgttaa a
21

<210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 190

Ile Asp Trp Asp Gly Val Lys
 1 5

<210> 191
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 191
 gcacgggtcga cttcggttgac tttttactac tttgactac
 39

<210> 192
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 192

Ala Arg Ser Thr Ser Leu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 193
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 193
 gacatccaga tgaccagtc 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> 194
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 194

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> 195
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 195
cagagcatta gcagctat
18

<210> 196
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 196

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 197

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 197

gctgcatcc
9

<210> 198

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 198

Ala Ala Ser
1

<210> 199

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 199

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc
30

<210> 200

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 200

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 201
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 201
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgagactc
 60
 tcctgtgcag cctctgagtt caccgtcggg accaaccaca tgaactgggt ccgccagggt
 120
 ccaggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttatagcg gtggtaacac attctacgca
 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacactt ccaagaacac gctgtatctt
 240
 caaatgaaca gcctgacagc agaggacacg gccgtatatt actgtgcgcg aggattgggg
 300
 ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctca
 345

<210> 202
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 202

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 Glu Phe Thr Val Gly Thr Asn
 20 25 30

His Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Leu Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 203
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 203
 gagttcaccg tcggtaccaa ccac
 24

<210> 204
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 204

Glu Phe Thr Val Gly Thr Asn His
 1 5

<210> 205
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 205
 atttatagcg gtggtaacac a
 21

<210> 206
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 206

Ile Tyr Ser Gly Gly Asn Thr

1

5

<210> 207
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 207
 gcgcgaggat tgggggggtat ggacgtc
 27

<210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 208

Ala Arg Gly Leu Gly Gly Met Asp Val
 1 5

<210> 209
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 209
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60

atcacttgcc gggcgagtca ggtcattagc aattatttag cctgggtatca gcagaaacca
 120

gggaaagttc ctaggctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct
 180

cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
 240

gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg cccctcggac gttcggccaa
 300

gggaccaagg tggaaatcaa a
 321

<210> 210
 <211> 107
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 210

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 Val Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 211

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 211

caggtcatta gcaattat
18

<210> 212

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 212

Gln Val Ile Ser Asn Tyr
1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 213
 gctgcatcc
 9

<210> 214
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 214

Ala Ala Ser
 1

<210> 215
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 215
 caaaagtata acagtgcgcc tcggacg
 27

<210> 216
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 216

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr
 1 5

<210> 217
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 217

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ggggggagtc cctgagactt
60

tactgtgcag cctctggatt cacctttagt aaatattgga tgaactgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaaggag atggaagtga gaaatactat
180

gtggactctg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactatat
240

ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagattat
300

tggggatcag gctactactt tgacttctgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca
360

<210> 218

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 218

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Arg Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Tyr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gly Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 219
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 219
 ggattcacct ttagtaaata ttgg
 24

<210> 220
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 220

Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr Trp
 1 5

<210> 221
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 221
 ataaaggag atggaagtga gaaa
 24

<210> 222
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 222

Ile Lys Gly Asp Gly Ser Glu Lys
 1 5

<210> 223
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 223

gcgagagatt attggggatc aggctactac tttgacttc
39

<210> 224

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 224

Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 225

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 225

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gaacattaac aactatttaa attggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaaaactcct gatctatgct gcatccagtt tccaaaatgc ggtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaata ccccgctcac tttcggcggg
300

gggaccaagg tggagatcaa a
321

<210> 226

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 226

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 Asn Ile Asn 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 Ala Ala Ser Ser Phe Gln Asn Ala 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 Asn Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 227
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 227
 cagaacatta acaactat
 18

<210> 228
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 228

Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 229
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 229
gctgcatcc
9

<210> 230
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 230

Ala Ala Ser
1

<210> 231
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 231
caacagagtt acaataacccc gctcact
27

<210> 232
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 232

Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 233
<211> 390
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 233
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagt ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctattgga tgagctgggt ccgccaggct
120

ccaggaagg ggctggagt ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat
180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat
240

ctgcaaatac acagcctgag agccgatgac acggctgtgt attactgtgc gagagatgat
300

attgtagtag taccagctcc tatgggatat tactactact acttcggtat ggacgtctgg
360

ggccaaggga ccacgggtcac cgtctcctca
390

<210> 234

<211> 130

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 234

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser 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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Pro Met Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 235
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 235
ggattcacct ttagtagcta ttgg
24

<210> 236
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 236

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp
1 5

<210> 237
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 237
ataaagcaag atggaagtga gaaa
24

<210> 238
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 238

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 239
<211> 69
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 239

gcgagagatg atattgtagt agtaccagct cctatgggat attactacta ctacttcggt
60

atggacgtc
69

<210> 240

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 240

Ala	Arg	Asp	Asp	Ile	Val	Val	Val	Pro	Ala	Pro	Met	Gly	Tyr	Tyr	Tyr
1				5					10					15	

Tyr	Tyr	Phe	Gly	Met	Asp	Val
			20			

<210> 241

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 241

gacatccaga tgaccagctc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

agggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtagac ttttggccag
300

gggaccaagc tggagatcaa a
321

<210> 242

<211> 107

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 242

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 Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 243
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 243
 cagggcatta gaaatgat
 18

<210> 244
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 244

Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 245
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 245
 gctgcatcc
 9

<210> 246
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 246

Ala Ala Ser
 1

<210> 247
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 247
 ctacagcata atagttaccc gtacact
 27

<210> 248
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 248

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 249
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 249

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggttcagc ctggcaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattttgcca tgcactgggt ccgacaagct
120

ccaggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga ctggtggtaa catggactat
180

gcgaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagagg acgccaagaa ttccctgtat
240

ctgcaaataa acagtctgag agctgcggac acggccttgt attactgtgt aaaagatata
300

agggggatag tggctacggg gggggccttt gatattctggg gccgagggac aatggtcacc
360

gtctcttca
369

<210> 250

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 250

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Phe
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Thr Gly Gly Asn Met Asp Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Asp Ile Arg Gly Ile Val Ala Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ile

100

105

110

Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 251
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 251
 ggattcacct ttgatgattt tgcc
 24

<210> 252
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 252

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Phe Ala
 1 5

<210> 253
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 253
 attagttgga ctggtggttaa catg
 24

<210> 254
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 254

Ile Ser Trp Thr Gly Gly Asn Met
 1 5

<210> 255
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 255
 gtaaaagata taagggggat agtggctacg gggggggcctt ttgatatc
 48

<210> 256
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 256

Val	Lys	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile
1				5					10					15	

<210> 257
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 257
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60

atctcttgcc gggcaagtca gaccattagc acttatTTaa attggtttca gcagaaacca
 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gtgtccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240

gaagatTTtg caacttatta ctgtcaacag agttacagta ccccatTCac tttcggcct
 300

gggaccaaag tggatatcaa a
 321

<210> 258
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 258

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Val Val 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 Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 259

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 259

cagaccatta gcacttat

18

<210> 260

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 260

Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
1 5

<210> 261

<211> 9

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 261
 gttgtgtcc
 9

<210> 262
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 262

Val Val Ser
 1

<210> 263
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 263
 caacagagtt acagtacccc attcact
 27

<210> 264
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 264

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 265
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 265

gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt caccgtcggc accaactaca tgaactgggt ccgccagggt
120

ccaggaagg gactggagtg gatctcagtt atttatagcg gtggtagcac attctacgca
180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacagactt cccagaacac gctgtatctt
240

caaatgaaca gcctgagacc tgaggacacg gccgtatatatt actgtgcgag aggtatacgt
300

ggttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttca
345

<210> 266

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 266

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 Val Gly Thr Asn
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gln Thr Ser Gln Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 267
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 267
 ggattcacgc tcggtaccaa ctac
 24

<210> 268
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 268

Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn Tyr
 1 5

<210> 269
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 269
 atttatagcg gtggtagcac a
 21

<210> 270
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 270

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 271
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 271
gcgagaggta tacgtggttt tgatatc
27

<210> 272
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 272
Ala Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile
1 5

<210> 273
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 273
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca 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> 274
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 274
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> 275
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 275
 cagagcatta gcagctat
 18

<210> 276
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 276

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 277
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 277

gctgcatcc

9

<210> 278

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 278

Ala Ala Ser

1

<210> 279

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 279

caacagagtt acagtacccc tccgatacc

30

<210> 280

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 280

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1

5

10

<210> 281

<211> 345

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 281

gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc cggggggggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggggtt taccatcagt accaactaca tgaactgggt cgcgcaggct

120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtcgagtt atttatagca gtggttccac atactatatac
180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agactcactt ccaagaacac ggtgtatctt
240

caaatgagca gcctgaattc tgaagacacg gccgtgtatt actgtgagag ggggatcagg
300

ggttttgata ttggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttca
345

<210> 282

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 282

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 Ile Ser Thr Asn
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ile Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Leu Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Asn Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 283

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 283
gggtttacca tcagttaccaa ctac
24

<210> 284
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 284
Gly Phe Thr Ile Ser Thr Asn Tyr
1 5

<210> 285
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 285
atttatagca gtggttccac a
21

<210> 286
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 286
Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 287
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 287
gcgaggggga tcaggggttt tgatatt
27

<210> 288
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 288

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile
 1 5

<210> 289
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 289
 gaagtgcagc tgggtggagtc ggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc
 60

tcctgtgcag cctctggatt caccattgat gatagtgccca tgcactgggt ccggcaaact
 120

ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga aaagtggtag cataggttat
 180

gcggactctg tgaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttccctctat
 240

ctgcaaataa acagtctgag agttgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagatata
 300

aggggcaact ggaactacgg gggaaactgg ttcgaccctt ggggccaggg aaccctggtc
 360

actgtctcct ca
 372

<210> 290
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 290

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asp Asp Ser
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Lys Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Lys Asp Ile Arg Gly Asn Trp Asn Tyr Gly Gly Asn Trp Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 291
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 291
 ggattcacca ttgatgatag tgcc
 24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 292

Gly Phe Thr Ile Asp Asp Ser Ala
 1 5

<210> 293
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 293
attagttgga aaagtggtag cata
24

<210> 294
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 294

Ile Ser Trp Lys Ser Gly Ser Ile
1 5

<210> 295
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 295
gtaaaagata taaggggcaa ctggaactac gggggaaact ggttcgaccc c
51

<210> 296
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 296

Val Lys Asp Ile Arg Gly Asn Trp Asn Tyr Gly Gly Asn Trp Phe Asp
1 5 10 15

Pro

<210> 297
<211> 345
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 297
gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtccagc ctgggggggctc cctgagactc
60

tcatgtgaag cctctggggt caccgtcggg gtcaaccaca tgaactgggt ccgccagggt
120

ccaggggaagg gtctggagtg ggtctcagtt attttcagta gtggtaggac attctacgga
180

gactacgtga aggggcgatt aaccatcttc agacaaacct cccagaacac ggtgtatctt
240

caaatgaata gcctgagaag tgaggacacg gccatatatt actgtgcgag agggattggc
300

ggtttggaca tctggggccg agggacaatg gtcaccgtct cttca
345

<210> 298

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 298

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 Glu Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Val Asn
20 25 30

His Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Ser Gly Arg Thr Phe Tyr Gly Asp Tyr Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ile Gly Gly Leu Asp Ile Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 299

<211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 299
 ggggttcaccg tcggtgtcaa ccac
 24

<210> 300
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 300

Gly Phe Thr Val Gly Val Asn His
 1 5

<210> 301
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 301
 attttcagta gtggtaggac a
 21

<210> 302
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 302

Ile Phe Ser Ser Gly Arg Thr
 1 5

<210> 303
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 303

gcgagagggga ttggcgggttt ggacatc
27

<210> 304
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 304

Ala Arg Gly Ile Gly Gly Leu Asp Ile
1 5

<210> 305
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 305

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggttcagc ctggcaggtc cctaagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcct tgcactgggt ccggcaagct
120

ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagtggga ctggtgggtac tatagactat
180

gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat
240

ctgcaaata gaagtctgag aactgaggac acggccatat attactgtac aagagatatc
300

cgggggaact ggaagtacgg aggctgggtc gaccctggg gccagggaac cctgggtcacc
360

gtctcctca
369

<210> 306
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 306

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Thr Gly Gly Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Asp Ile Arg Gly Asn Trp Lys Tyr Gly Gly Trp Phe Asp Pro
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 307
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 307
 ggattcacct ttgatgatta tgcc
 24

<210> 308
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 308

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 309
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 309

attagttgga ctggtggtac tata
24

<210> 310

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 310

Ile Ser Trp Thr Gly Gly Thr Ile
1 5

<210> 311

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 311

acaagagata tccgggggaa ctggaagtac ggaggctggt tcgacccc
48

<210> 312

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 312

Thr Arg Asp Ile Arg Gly Asn Trp Lys Tyr Gly Gly Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 313

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 313

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggactgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gcctactata tgcactgggt gcgacaggcc
120

cctgggtcaag gacttgactg gatgggatgg atcagcccta acagtgggtt cacaaactat
180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcaa cacattttat
240

atggagctga gtggactgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gcgagagggg
300

tctactcacc acaattcttt cgacccctgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca
360

<210> 314

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 314

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr 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 Ala Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Phe Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ser Thr His His Asn Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 315

<211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 315
 ggatacacct tcaccgccta ctat
 24

<210> 316
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 316

Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Tyr
 1 5

<210> 317
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 317
 atcagcccta acagtgggtt caca
 24

<210> 318
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 318

Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr
 1 5

<210> 319
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 319

gcgcgagagg gttctactca ccacaattct ttcgacccc
39

<210> 320
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 320

Ala Arg Glu Gly Ser Thr His His Asn Ser Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 321
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 321

gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtccaac cggggggggtc cctgaggctc
60

tcctgtgcag cctctggggt caccgtcggc actaacttca tgaattgggt ccgccaggct
120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagcg atttatagcg gtggtaccgc taactacgca
180

gactccgtga agggccgatt caccatttcc agagacactt ccaggaacac gctgtatctt
240

caaatgaaca gcctgagaac tgaggacacg gccgtttatt attgtgagag aggggggggt
300

atggacgtct ggggccaaag gaccacgggt accgtctcct ca
342

<210> 322
<211> 114
<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 Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn

20

25

30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Tyr Ser Gly Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Arg Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 323
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 323
 gggttcaccg tcggtactaa cttc
 24

<210> 324
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 324

Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn Phe
 1 5

<210> 325
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 325
 atttatagcg gtggtaccgc t
 21

<210> 326
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 326
 Ile Tyr Ser Gly Gly Thr Ala
 1 5

<210> 327
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 327
 gcgagagggg ggggtatgga cgtc
 24

<210> 328
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 328
 Ala Arg Gly Gly Gly Met Asp Val
 1 5

<210> 329
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 329
 caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc
 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcaac acctatgttc tcagctgggt gcgacaggcc
 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagag atcatcccta tcttaggtgc agcaaactac
180

gcacagaact tccagggcag agtcactttt accacggacg aatccacgaa tacagcctac
240

atggacctga gcagcctaag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgg
300

acctccgggg gggtcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca
354

<210> 330

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 330

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 Asn Thr Tyr
20 25 30

Val Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Thr Ser Gly Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 331

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 331

ggaggcacct tcaacaccta tgtt
24

<210> 332

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 332

Gly Gly Thr Phe Asn Thr Tyr Val
1 5

<210> 333

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 333

atcatcccta tcttaggtgc agca
24

<210> 334

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 334

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala
1 5

<210> 335

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 335

gcgagagatc ggacctccgg ggggttcgac ccc
33

<210> 336
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 336

Ala Arg Asp Arg Thr Ser Gly Gly Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 337
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 337

cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtggagaagc ctggggcctc agtgaaggtc
 60

tcctgcaagg cttctgggta catctttacc cactatggta tcagctgggt gcgacaggcc
 120

cctggacaag gacttgagtg ggtgggctgg atcagccctt acaatgggta cacagactat
 180

gcacagaaac tccagggcag agtcaccttg accacagaca catccacgac cacagcctac
 240

atggagctga ggaacctgag atctgacgac acggccatgt attactgttc gagagggagg
 300

ggcccttact ggtccttcga tctctggggc cgtggcaccc tggtcaccgt ctcctca
 357

<210> 338
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 338

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr His Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Asn Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Arg Gly Arg Gly Pro Tyr Trp Ser Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 339
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 339
 gggtacatct ttaccacta tgg
 24

<210> 340
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 340

Gly Tyr Ile Phe Thr His Tyr Gly
 1 5

<210> 341
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 341

atcagccctt acaatggtta caca
24

<210> 342
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 342

Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Tyr Thr
1 5

<210> 343
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 343
tcgagaggga ggggccctta ctggtccttc gatctc
36

<210> 344
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 344

Ser Arg Gly Arg Gly Pro Tyr Trp Ser Phe Asp Leu
1 5 10

Đặc điểm của H4H8314N-DFO

SDS-PAGE: Đặc điểm di động tương tự của PD-L1 mẹ và thể tiếp hợp DFO

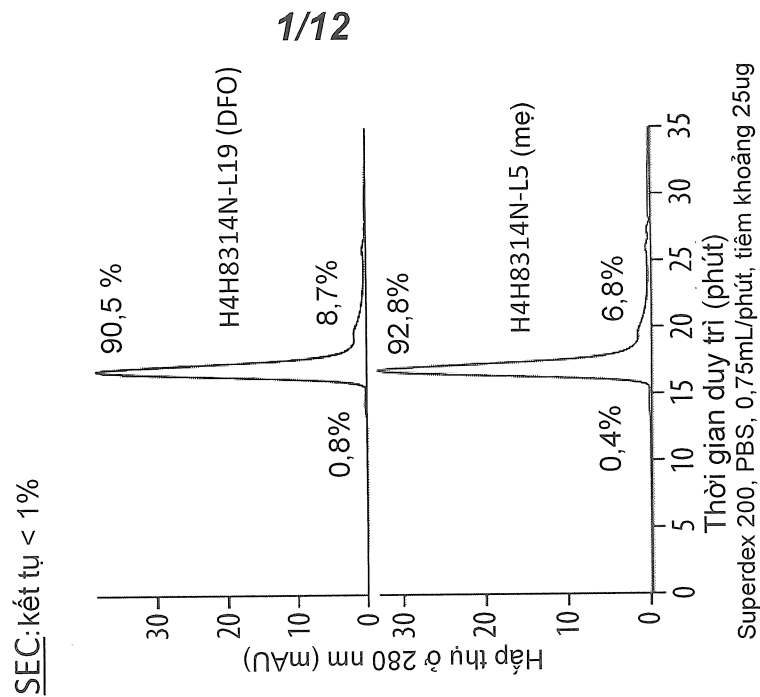
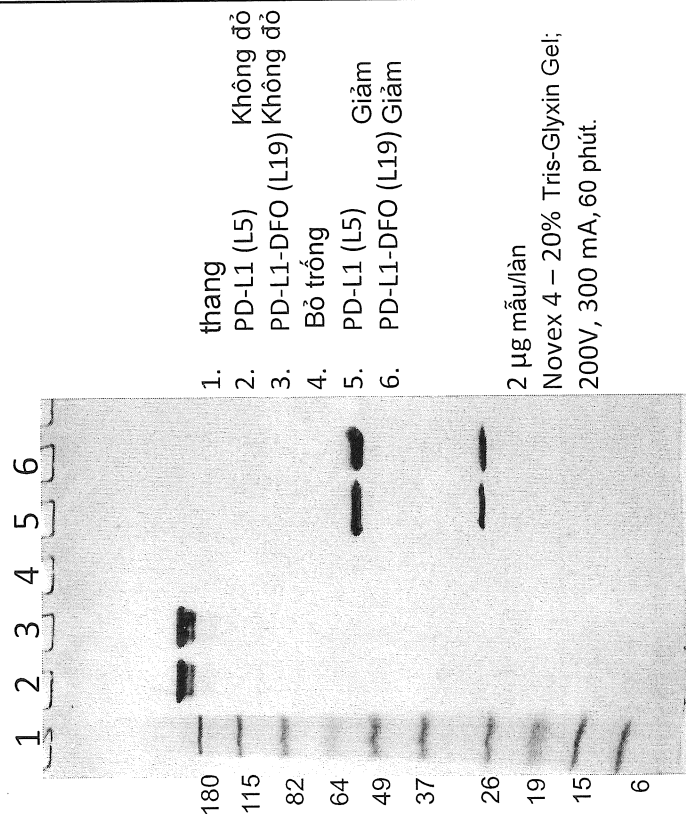


FIG. 1

2/12

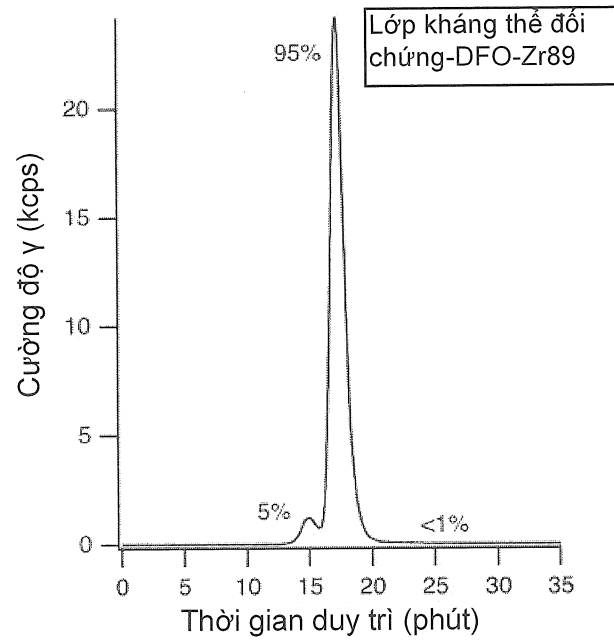


FIG. 2A

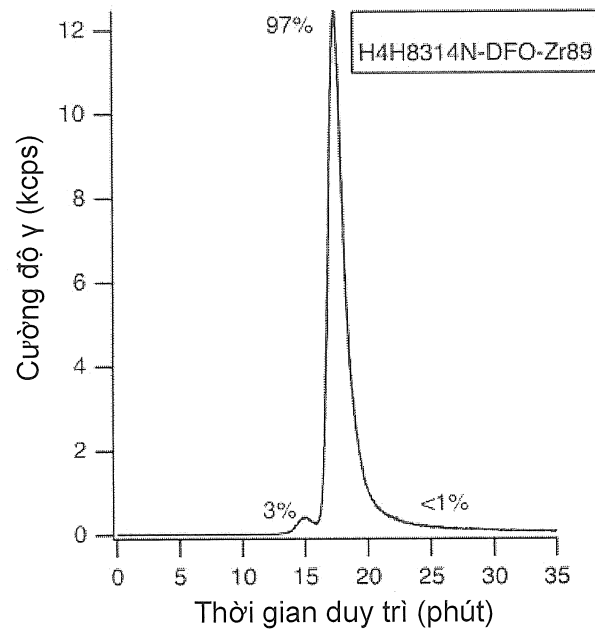


FIG. 2B

3/12

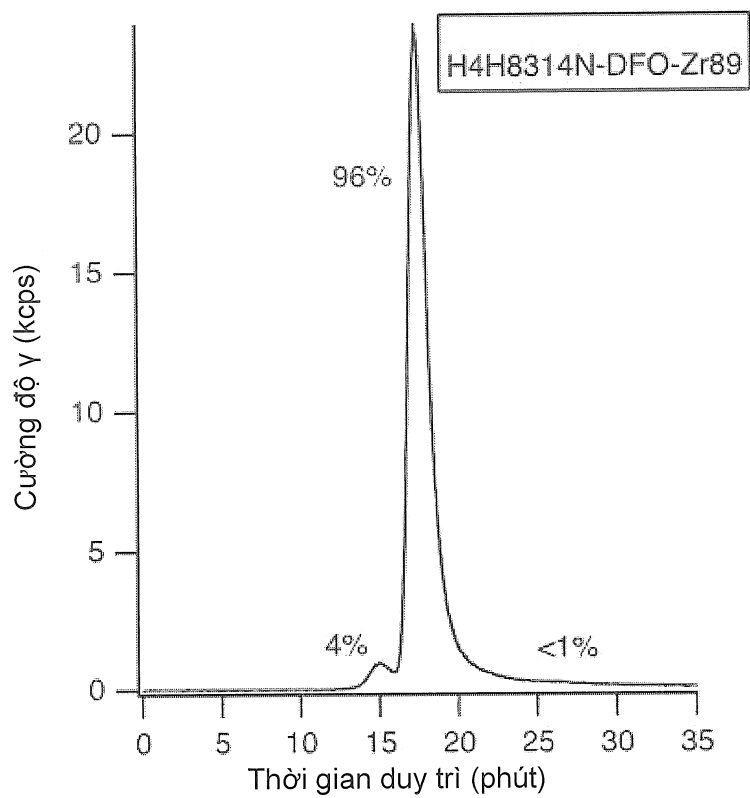


FIG. 3

4/12

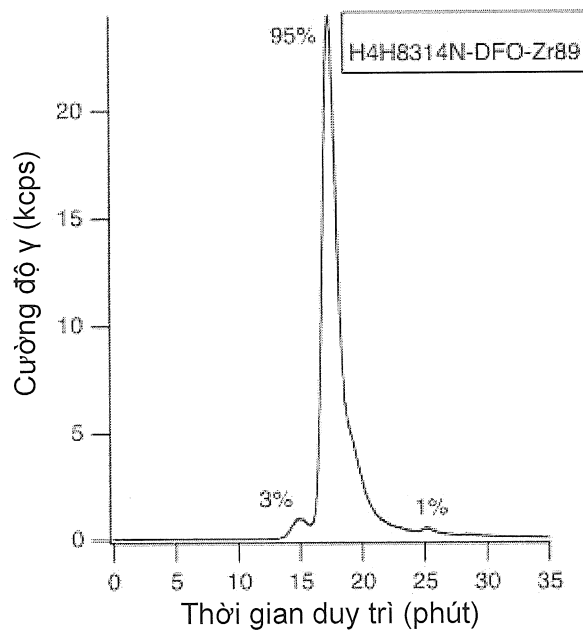
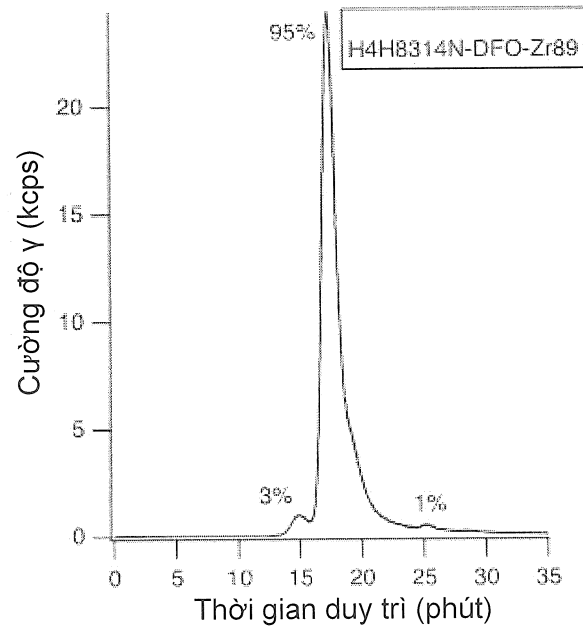


FIG. 4

5/12

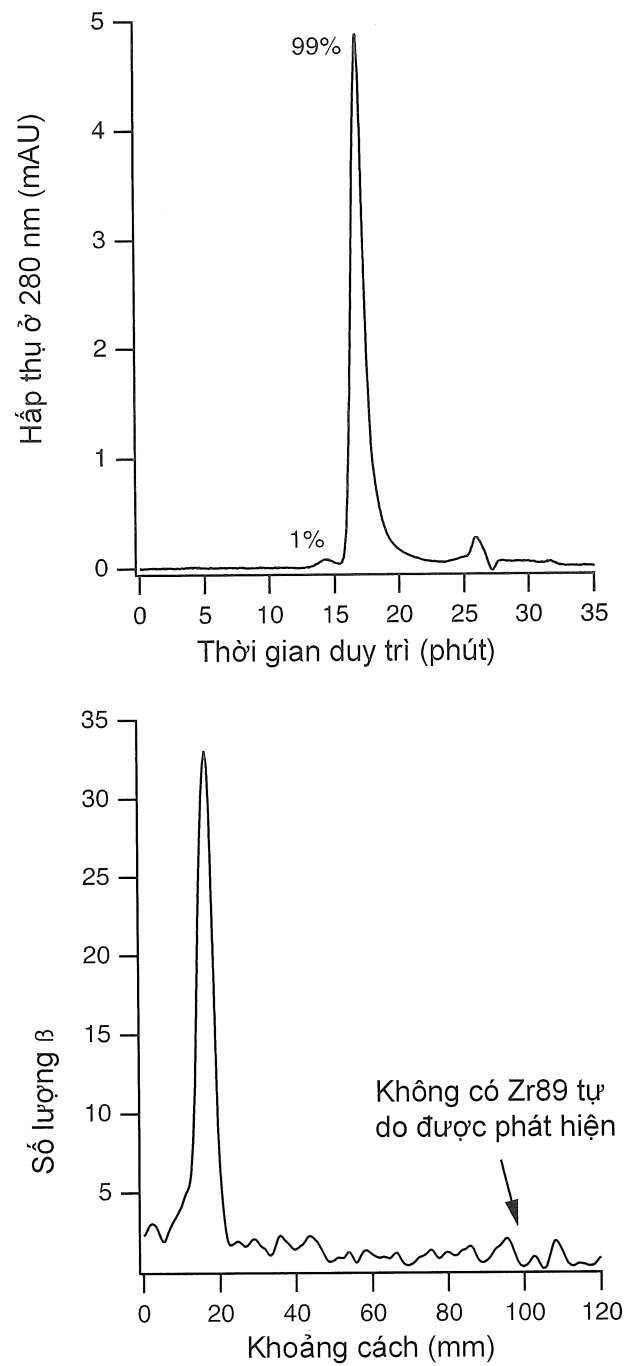


FIG. 5

6/12

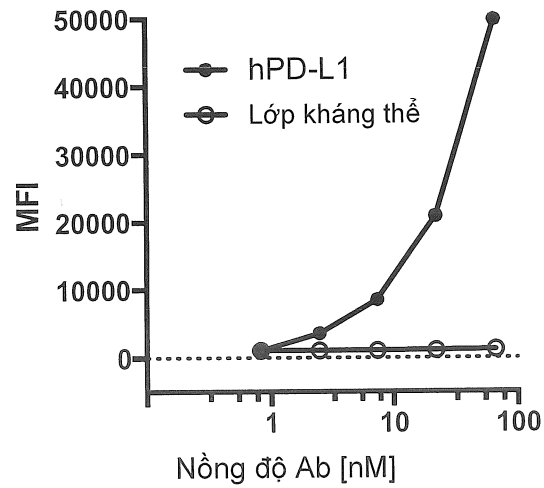
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}

FIG. 6A

LOX-IMVI

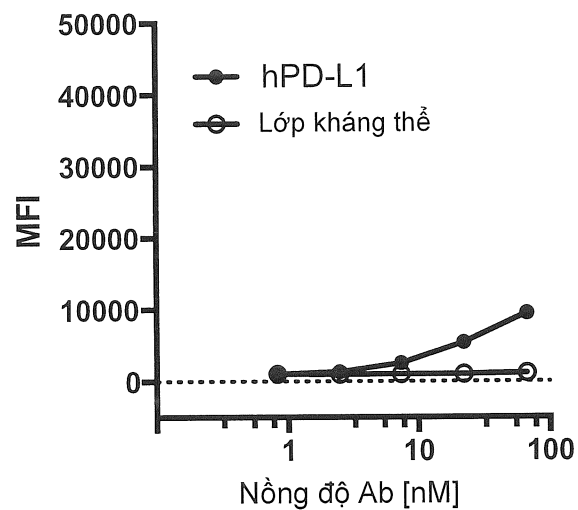


FIG. 6B

7/12

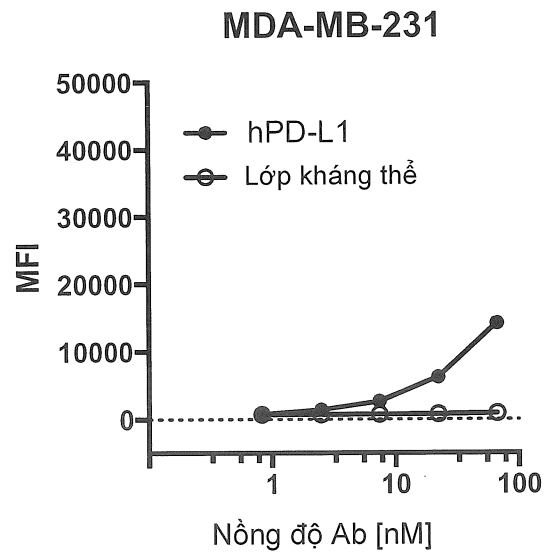


FIG. 6C

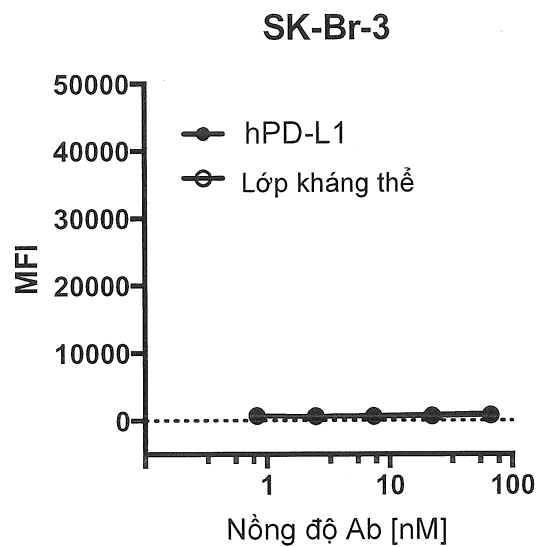


FIG. 6D

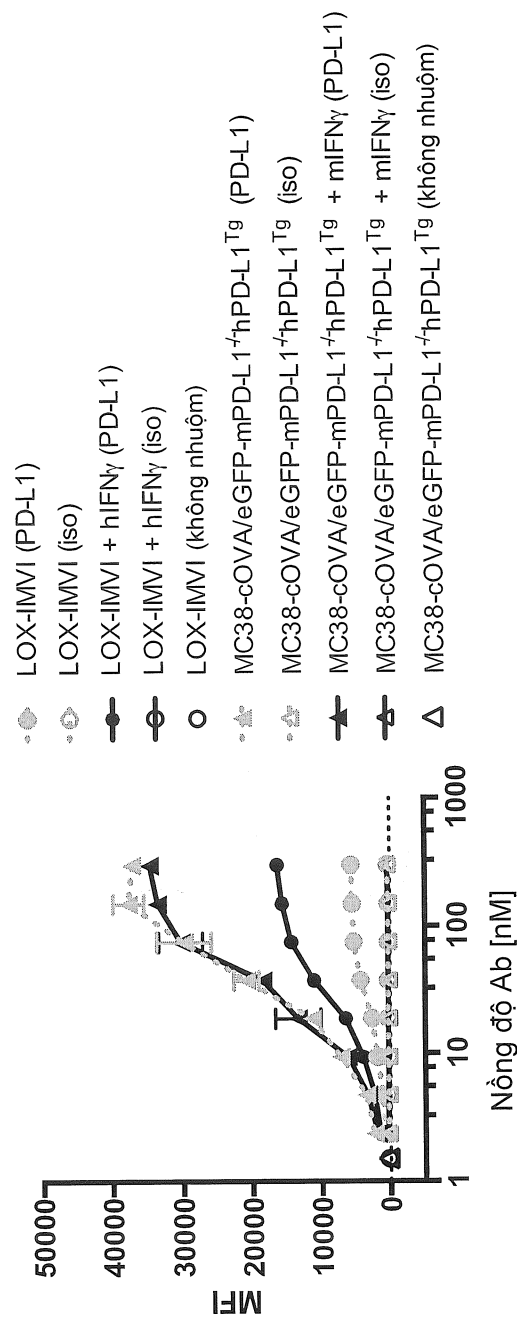


FIG. 7

9/12

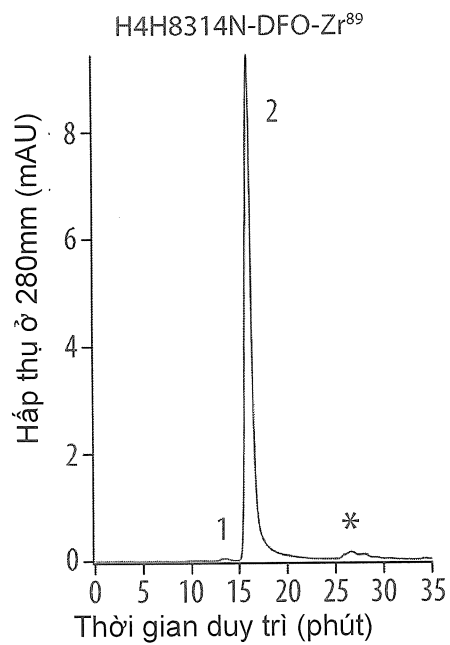


FIG. 8A

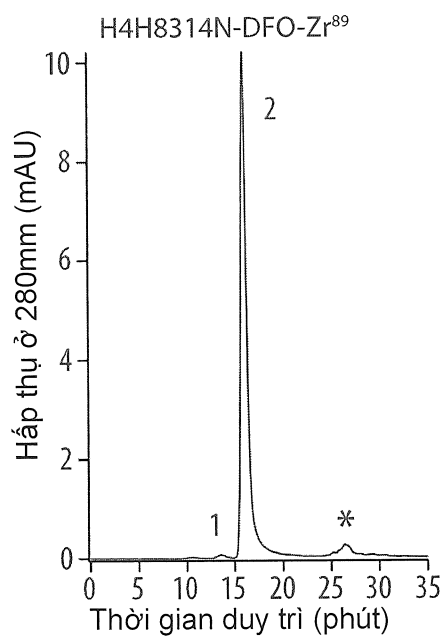


FIG. 8B

10/12

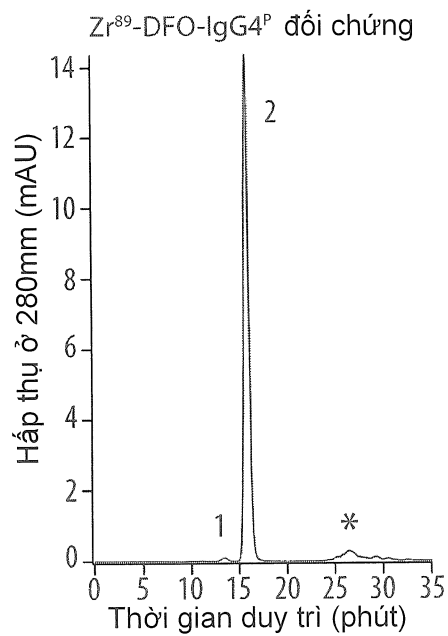


FIG. 8C

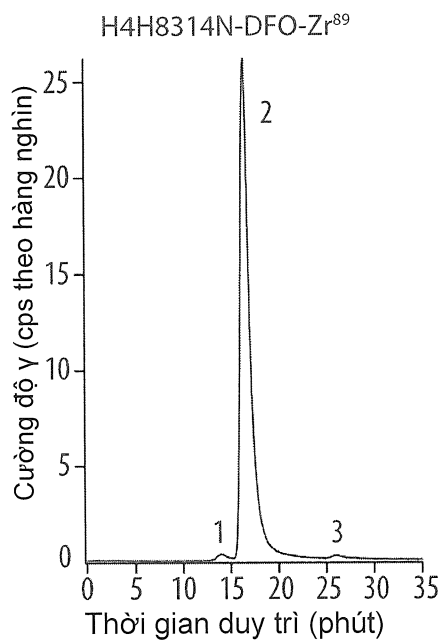


FIG. 8D

11/12

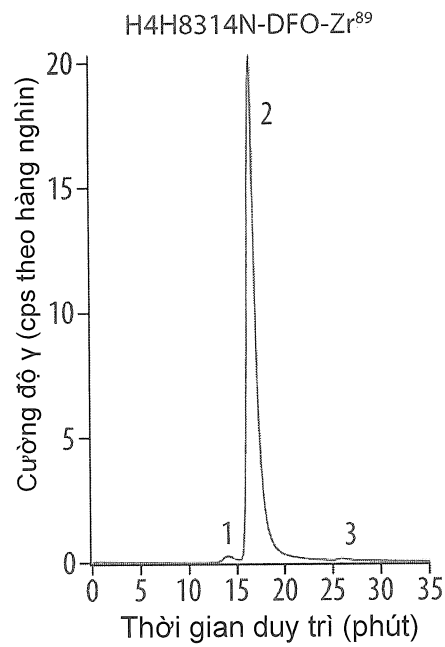


FIG. 8E

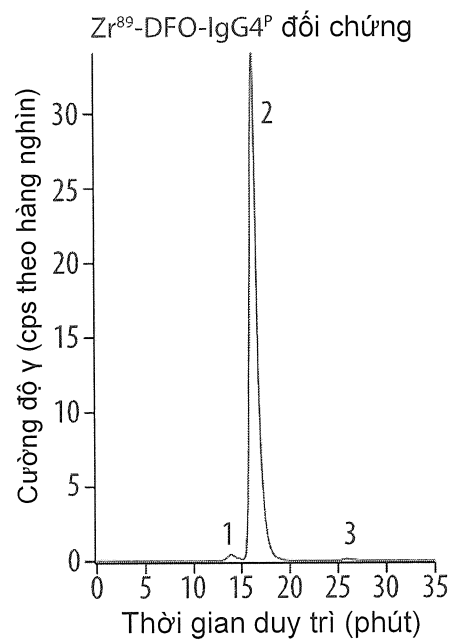


FIG. 8F

12/12

Sự phân bố sinh học của H4H8314N-DFO-Zr89 trong mô thu được từ chuột *PD-1^{hu/hu} PD-L1^{hu/hu}*

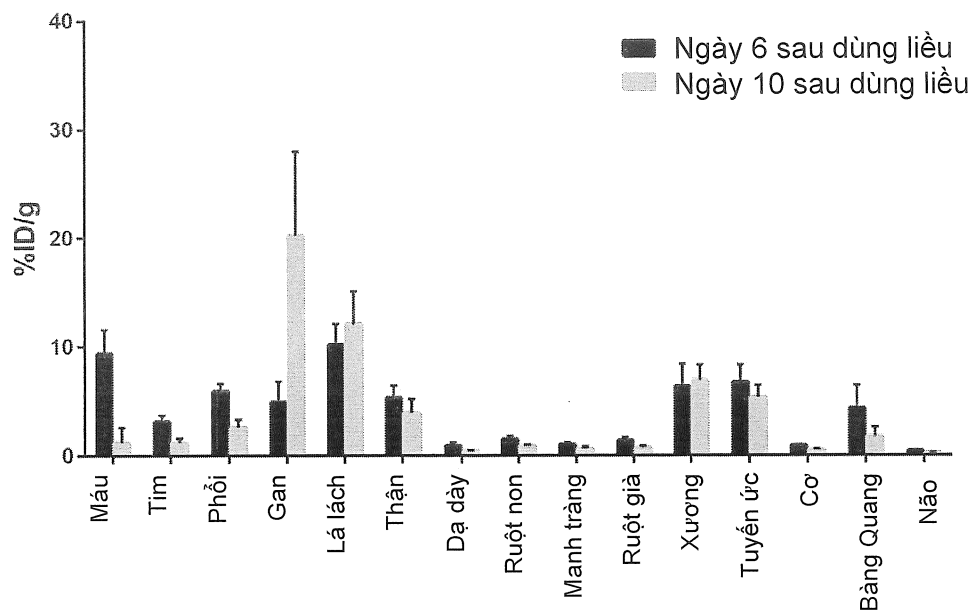


FIG. 9